

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare



“Ruolo patogenetico del trasportatore per l’L-glutammato (GltT) in un modello murino di meningite meningococcica”

**Coordinatore:
Prof. Carmelo Bruno Bruni**

**Candidato:
Dott. Florentia Lamberti**

Anno

2007

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

**Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare
“Luigi Califano”**

Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare

Coordinatore Prof. Carmelo Bruno Bruni

**Sede amministrativa:
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare
“Luigi Califano”**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

**Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare
“Luigi Califano”**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare
XX ciclo**

**“Ruolo patogenetico del trasportatore per l’L-glutammato
(GltT) in un modello murino di meningite meningococcica”**

Canidato: Dott.ssa Florentia Lamberti

Docente guida: Prof.ssa Paola Salvatore

INDICE

PREMESSA	6
INTRODUZIONE	8
<i>Neisseria meningitidis</i> : caratteri generali.....	8
<i>Neisseria meningitidis</i> come paradigma di variazione genetica.....	10
Variazione genetica e regolazione genica: strategie per un rapido adattamento microambientale.....	12
Rilevanza funzionale della variazione genetica: il ciclo infettivo di <i>Neisseria meningitidis</i>	17
Patogenesi e fisiopatologia della malattia meningococcica.....	28
Epidemiologia, prevenzione e controllo dell'infezione da meningococco.....	34
Modelli animali per lo studio della meningite meningococcica.....	38
Geni metabolici implicati nella patogenicità di <i>N. meningitidis</i>	43
Metabolismo del carbonio in <i>N. meningitidis</i>	45
Influenza del lattato sul metabolismo e sulla patogenicità di <i>N. meningitidis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	50
Metabolismo del glutammato in <i>N. meningitidis</i>	53
I trasportatori del glutammato.....	59
GltT: un nuovo trasportatore per l'L-glutammato in <i>N. meningitidis</i>	63
SCOPO DELLA RICERCA	68
MATERIALI E METODI	70
Ceppi batterici e condizioni di crescita.....	70
Ceppi murini.....	70
Preparazione della dose d'infezione.....	71
Tecnica di infezione	71
Saggio di <i>survival</i>	72
Analisi microbiologica ed istologica.....	72
Saggio di confezione e valutazione dell'indice di competizione	74
Analisi statistiche.....	74
Trasformazione dei meningococchi.....	75

Estrazione e purificazione del DNA cromosomale da ceppi di <i>N. meningitidis</i>	75
Procedure di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR).....	76
Analisi del DNA batterico tramite Southern blot.....	76
Plasmidi e procedure di clonaggio.....	77
 RISULTATI	78
Modello murino di meningite meningococcica.....	78
Profilo di <i>survival</i> degli animali infettati con il ceppo di <i>N. meningitidis</i> 93/4286 ^{wt}	80
Conte batteriche nell'ospite animale dopo l'infezione con il ceppo di <i>N. meningitidis</i> 93/4286 ^{wt}	81
Valutazione dei parametri clinici della meningite meningococcica.....	82
Caratterizzazione istopatologica della meningite meningococcica.....	85
Inattivazione funzionale di geni potenzialmente implicati nel processo invasivo.....	88
Profilo di <i>survival</i> degli animali infettati con i ceppi isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS.....	94
Titoli batterici negli animali infettati con i ceppi isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS.....	96
Valutazione dei parametri clinici della meningite meningococcica degli animali infettati con il ceppo 93/4286 ^{wt} e con i ceppi isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS	97
Analisi istopatologica degli animali infettati con il ceppo 93/4286 ^{wt} e con i ceppi isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS	100
Saggio di coinfezione con il ceppo 93/4286 ^{wt} ed il mutante isogenico 93/4286ΩgltT e valutazione dell'indice di competizione	102
 DISCUSSIONE	104
 RINGRAZIAMENTI	113
 BIBLIOGRAFIA	115

PREMESSA

Il genere *Neisseriae* comprende un'ampia varietà di specie non patogene, tra cui *Neisseria lactamica*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, naturali commensali delle prime vie respiratorie. L'importanza clinica di questo gruppo di cocchi piogeni è però legata a due specie patogene, *Neisseria gonorrhoeae* (gonococco) e *Neisseria meningitidis* (meningococco), identificate rispettivamente nel 1879 da Albert Neisser e nel 1887 Anton Weichselbaum.

N. gonorrhoeae e *N. meningitidis* sono patogeni strettamente correlati con un solo habitat: l'uomo; ad oggi non sono conosciuti ulteriori serbatoi o vettori di infezione. Se da un lato questo ristretto spettro d'ospite costituisce un punto di forza del modello *Neisseria*, in quanto minimizza le possibili interazioni che il batterio può stabilire durante l'infezione e semplifica l'individuazione delle forze evolutive che governano il comportamento microbico, dall'altro tale fenomeno preclude l'uso di un modello d'infezione animale naturale.

N. gonorrhoeae è l'agente eziologico della gonorrea, malattia sessualmente trasmessa e descritta fin dai tempi più antichi (si ritrova, per esempio, nel papiro di Ebers che risale circa al 1550 a.C.); rappresenta, ancora oggi, una delle più frequenti malattie batteriche contagiose per l'uomo, nonostante la disponibilità di farmaci antimicrobici sempre più efficaci.

N. meningitidis causa frequentemente infezioni nasofaringee localizzate asintomatiche, similmente alle colonizzazioni mucosali delle specie non patogene di *Neisseria*, ma occasionalmente ed in condizioni non ancora ben determinate, il meningococco dissemina, causando severe malattie che mettono a rischio la vita come la meningite meningococcica, la batteremia, e l'artrite settica. *N. meningitidis* è pertanto considerato un batterio dal doppio stile di vita: commensale-patogeno. I fattori responsabili del passaggio dallo stato commensale a quello patogeno non sono però ancora ben chiari.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi allo scopo di identificare i potenziali fattori di virulenza responsabili dell'azione patogena del batterio, che risulterà, di conseguenza, attenuata nei ceppi che presentano mutazioni dei geni responsabili dell'espressione di tali determinanti di patogenicità. Tali geni, pertanto, non saranno presenti o saranno differenzialmente espressi nei ceppi apatogeni. Il potenziale patogeno di un ceppo batterico può essere, infatti, dovuto alla presenza di sequenze patogeno-specifiche, ovvero può essere il risultato dell'espressione differenziale di determinati geni.

INTRODUZIONE

Neisseria meningitidis: caratteri generali

Le Neisserie sono tipici batteri Gram negativi, non sporigeni, provvisti di pili, le cui cellule assumono una forma coccoide e si ritrovano spesso in coppia, sotto forma di diplococchi appaiati a “chicco di caffè”; più raramente formano tetradi o piccoli grappoli. I singoli cocci sono di piccole dimensioni ed hanno un diametro di circa 0,6-1,0 μ m (Fig. 1).

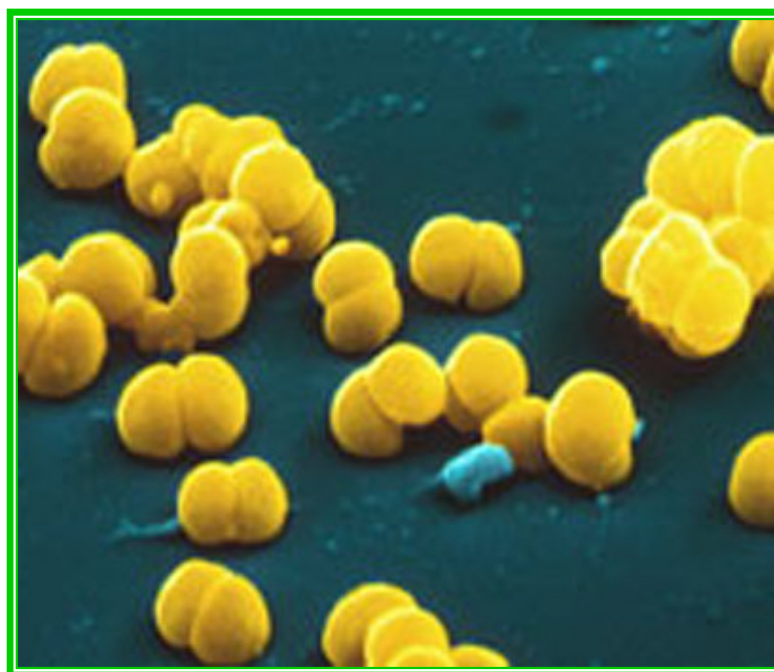


Figura 1. Fotografia al microscopio a scansione di *Neisseria meningitidis*

Le Neisserie si moltiplicano in maniera ottimale in ambiente aerobio, umido e povero di ossigeno, che contiene il 5-10% di CO₂, a temperature comprese tra i 35 ed i 37°C. I gonococchi ed alcuni ceppi di meningococco crescono in anaerobiosi se coltivati in presenza di NO₂⁻.

Tutti i membri di questo genere, patogeni e commensali, producono il citocromo C, responsabile della positività del test dell'ossidasi. Le specie di *Neisseria* si distinguono in

base alla loro caratteristica capacità di utilizzare zuccheri semplici e composti come fonti di energia: normalmente i meningococchi fermentano sia il glucosio che il maltosio mentre i gonococchi fermentano solo il glucosio.

Le Neisserie possono essere considerate “batteri fastidiosi” in quanto hanno esigenze nutrizionali abbastanza complesse. La crescita dei meningococchi e dei gonococchi è sensibile agli acidi grassi liberi che contaminano il terreno, ma l’effetto inibente di tali composti tossici per i microrganismi può essere eliminato aggiungendo al terreno sangue o amido. Per la crescita e l’isolamento colturale di questi microrganismi si utilizzano terreni arricchiti come agar-cioccolato e l’agar GC (*GonoCoccal Agar*) che, insieme a diversi altri nutrienti, contiene anche amido.

Le Neisserie patogene sono particolarmente sensibili a condizioni ambientali sfavorevoli per la crescita: vanno infatti rapidamente incontro ad autolisi e le colture possono morire in pochi giorni anche a temperatura ambiente.

Contrariamente alle altre Neisserie, i meningococchi sono circondati da una capsula polisaccaridica e, sulla base delle differenze antigeniche dei loro polisaccaridi capsulari, essi vengono suddivisi in almeno 13 sierogruppi; sebbene meningococchi capsulati appartenenti a tutti i sierogruppi colonizzino frequentemente il nasofaringe e possano potenzialmente causare la malattia sistemica, più del 99% delle infezioni sono sostenute da ceppi appartenenti ai sierogruppi A, B, C, 29E, W-135 e Y. I sierogruppi sono poi, ulteriormente suddivisi in venti sierotipi (che identificano gli antigeni proteici di PorB), dieci siero-subtipi (che identificano gli antigeni di PorA), ed in immunotipi in base alle proprietà immunologiche delle proteine della membrana esterna e del lipo-oligosaccaride (Frash *et al.*, 1985). Più recentemente è stato sviluppato un metodo per classificare i ceppi di *N. meningitidis* attraverso la mobilità elettroforetica dei loro enzimi metabolici. Infatti, poiché il tratto nasofaringeo dell’uomo rappresenta l’unico *reservoir* conosciuto di *N. meningitidis* e la maggior parte dei pazienti con malattia meningococcica non ha avuto

precedentemente contatti con soggetti malati, si presume che i portatori asintomatici (10% della popolazione) siano la principale sorgente di trasmissione di ceppi patogeni. Per questa ragione lo studio dello stato di portatore può contribuire significativamente alla conoscenza della epidemiologia e della patogenesi delle malattie causate da *N. meningitidis* (Broome, 1986). Il principale problema dello studio dei portatori di meningococco è l'assenza di un efficiente sistema di marcatura genetica per l'identificazione e la classificazione dei ceppi e di metodi per determinare le relazioni tra i ceppi isolati. I metodi convenzionali di tipizzazione basati sulla specificità immunologica dei polisaccaridi capsulari (sierogruppi) e delle altre proteine di membrana (sierotipi) sono, infatti, inadeguati, perché il 90% dei ceppi isolati da portatori sani non reagisce con gli antisieri per polisaccaridi capsulari e il 50-60% non reagisce con gli antisieri per le proteine di membrana (Frash, 1979).

Per tale ragione sono stati sviluppati efficienti sistemi di marcatura genetica per permettere l'identificazione e la classificazione dei ceppi attraverso la mobilità elettroforetica dei loro enzimi metabolici e l'analisi delle varianti alleliche ricorrenti in diversi loci. Il *MultiLocus Enzyme Electrophoresis* (Selander *et al.*, 1986) ed il *MultiLocus Sequence Typing* (Maiden *et al.*, 1998; Tzanakaki *et al.*, 2001) sono sistemi ad alta risoluzione per la caratterizzazione del genoma di tutti gli isolati e per la valutazione delle relazioni genetiche tra i ceppi: l'analisi di numerosi ceppi isolati in varie parti del mondo ha rivelato l'esistenza di una estesa diversità genetica all'interno della specie.

***Neisseria meningitidis* come paradigma di variazione genetica**

Una serie di recenti studi enfatizza l'importanza degli scambi genetici orizzontali nell'evoluzione e nell'epidemiologia delle specie di *Neisseria*. È emerso che un continuo flusso orizzontale di materiale genetico influenza la composizione cromosomale non solo

delle specie patogene di *Neisseria*, ma anche di molte specie commensali. Esistono, infatti, numerose evidenze di scambi orizzontali di materiale genetico tra specie commensali e patogene di *Neisseria*, tra meningococchi e gonococchi, e tra diversi ceppi nell'ambito di una determinata specie di *Neisseria*, responsabili della generazione di geni a mosaico (Halter *et al.*, 1989; Manning *et al.*, 1991; Feavers *et al.*, 1992; Spratt *et al.*, 1992; Zhou e Spratt, 1992).

La specie ha, quindi, una struttura di tipo non clonale, ovvero “panmittica”, della popolazione caratterizzata, tuttavia, dalla occasionale sovracrescita di cloni responsabile di epidemie o microepidemie (Achtman, 1995). Ad esempio in uno studio epidemiologico è stato dimostrato che due gruppi clonali, i complessi ET-5 e ET-37 (ET= tipi elettroforetici), sono stati responsabili del 91% dei casi di malattia nel corso di una epidemia verificatasi in Norvegia nel 1984. Essi, inoltre sono stati identificati solo nel 7% e 9%, rispettivamente, delle colture faringee di soggetti sani e la loro frequenza in campioni della popolazione umana è solo dello 0.7% per ET-5 e dello 0.8% per ET-37. Il complesso di cloni più rappresentato tra gli isolati da portatori sani (19%) non è mai stato riscontrato in soggetti con malattia meningococcica; ciò suggerisce che questi cloni abbiano un basso potenziale di virulenza (Caugant *et al.*, 1988).

Lo scambio genetico orizzontale si può immaginare come un meccanismo adattativo a lungo termine che i batteri utilizzano per rispondere ai continui ed enormi cambiamenti ambientali e per assicurare la flessibilità genetica delle specie di *Neisseria*, anche se risulta difficile fornire una stima precisa della frequenza e dei tempi con cui tali scambi avvengono in natura.

La recente costruzione della mappa fisica e genetica di diversi ceppi di gonococco e meningococco ha permesso di svelare una peculiare organizzazione genomica delle *Neisserie*, che differisce notevolmente rispetto a quella di altri patogeni Gram-negativi. Da queste analisi risulta, infatti, che molti geni correlati funzionalmente, come ad esempio i

geni *pil* strutturali ed accessori (*pilS*, *pilE*, *pilC1*, 2, *pilD*, *pilT*) sono distribuiti su tutto il genoma, allo stesso modo dei geni *opa*, di cui sono presenti 11 copie nel cromosoma di *N. gonorrhoeae*. Inoltre, raramente si trovano in *Neisseria* geni trascrizionalmente uniti (operoni), anche se esistono alcune eccezioni, come ad esempio il cluster strettamente organizzato dei geni capsulari (*cps*) del meningococco (Frosch *et al.*, 1989). Un altro aspetto degno di nota del genoma di *Neisseria* è rappresentato dalla presenza di famiglie di geni le cui sequenze divergono in maniera significativa tra i diversi sierogruppi.

Non è ancora ben chiaro se la peculiare organizzazione cromosomica delle specie di *Neisseria* sia correlata con altre caratteristiche tipiche di questo microrganismo, come la trasformazione naturale, la variabilità genetica e di popolazione. Soprattutto, non è noto se la plasticità genomica trovata nelle specie di *Neisseria* sia correlata con lo stile di vita del microrganismo, caratterizzato da uno spettro d'ospite estremamente limitato e dalla capacità di causare infezioni persistenti, oppure se semplicemente rifletta il fatto che questi batteri siano giovani in termini di evoluzione ed ancora all'inizio di un processo adattativo nei confronti del loro ospite.

Variazione genetica e regolazione genica: strategie per un rapido adattamento microambientale

Le popolazioni microbiche devono adattarsi non solo ai cambiamenti ambientali a lungo termine nel corso della loro coevoluzione con l'ospite, ma anche ai frequenti cambiamenti microambientali, che si verificano, per esempio, durante il corso di un'infezione. Per rispondere a tale necessità, i microrganismi hanno sviluppato intelligenti programmi adattativi come la variazione genetica e la regolazione genica, due meccanismi genetici compatibili e spesso interconnessi.

La variazione genetica consiste in cambiamenti spontanei del DNA, ereditati dalla progenie e spesso reversibili; questi cambiamenti sono casuali ed in sostanza inducono la sintesi di prodotti genici alternativi. Come conseguenza, la variazione genetica genera popolazioni eterogenee di un determinato ceppo microbico, in modo tale che una frazione della popolazione stessa possa esibire un appropriato adattamento microambientale.

Al contrario, la seconda strategia di adattamento microbico, la regolazione genica, influenza la popolazione batterica nella sua globalità: in risposta ad un determinato stimolo ambientale, come la temperatura, l'osmolarità, oppure specifiche sostanze, i batteri modificano l'espressione genica in maniera coordinata per meglio adattarsi alla nuova condizione.

Evidentemente, entrambe le strategie hanno specifici vantaggi per i microrganismi: mentre la variazione genetica protegge meglio una piccola parte della popolazione da un'ampia varietà di imprevedibili cambiamenti, la regolazione genica realizza un preciso processo adattativo per il beneficio dell'intera popolazione. Sebbene *Neisseria* sia considerato paradigma della variabilità genetica, i processi di regolazione genica sembrano giocare un ruolo altrettanto importante nella patogenicità di questi batteri. Sono stati, infatti, identificati alcuni sistemi per la risposta a situazioni di stress, quali temperatura elevata (Meyer *et al.*, 1990; 1994), crescita in aerobiosi/anaerobiosi (Householder *et al.*, 1999; 2000; Lisseden *et al.*, 2000), e limitata disponibilità di ferro (Genco e Desai, 1996; Schryvers e Stjilikovic, 1999). Tali sistemi di regolazione agiscono a livello trascrizionale ed influenzano il fenotipo di una popolazione nella sua globalità.

La variazione genetica comprende due principali meccanismi: la variazione di fase e la variazione antigenica. Si tratta, in entrambi i casi, di importanti strategie di sopravvivenza messe in atto dai meningococchi.

La variazione antigenica consiste nell'elaborazione di versioni strutturalmente differenti di determinati componenti di superficie quali i pili di tipo IV, le proteine dell'opacità e l'LPS.

Grazie a tale strategia adattativa il meningococco è in grado, da un lato, di eludere la risposta immunitaria dell'ospite, dall'altro di selezionare le varianti biologicamente più attive di talune strutture superficiali ottimizzando così l'adesione e l'invasione.

Un'interessante caratteristica di numerose strutture di superficie (pili, proteine Opa, LPS), che svolgono una funzione essenziale nel processo infettivo di *Neisseria*, è il fatto che esse sono rappresentate nel genoma da famiglie geniche e vanno incontro a variazione della loro struttura. L'esempio più rappresentativo di variazione antigenica è quello della subunità maggiore del pilus, PilE o pilina, che si realizza attraverso vari meccanismi di ricombinazione genica, con una frequenza elevata, circa 10^{-4} per divisione cellulare. Nel genoma di *Neisseria* sono presenti copie geniche multiple, la maggior parte delle quali non sono espresse, copie geniche incomplete (silenti o criptiche; *pilS*), mentre solo una o due di queste rappresentano copie geniche espresse (*pilE*); le copie *pilS* costituiscono un repertorio di sequenze diverse che vengono utilizzate per la ricombinazione con *pilE* per generare differenti molecole di pilina. A livello molecolare il fenomeno è mediato da eventi di ricombinazione tra loci silenti *pilS* e il locus di espressione *pilE* con formazione di nuove combinazioni di geni *pilE* (Seifert, 1996). Gli eventi di ricombinazione sono unidirezionali (conversione genica) e avvengono a livello di sei brevi regioni chiamate "minicassette", tra le quali sono presenti brevi sequenze altamente conservate. Le minicassette rappresentano forme di deposito codificanti l'informazione che permette l'espressione di diversi antigeni (Meyer *et al.*, 1990). Questa notevole variabilità della struttura primaria della pilina causa profondi cambiamenti dell'immunoreattività, delle modificazioni post-traduzionali e delle funzioni di adesione.

Per variazione di fase si intende l'oscillazione reversibile tra stati di espressione alternativa di determinati geni. Infatti, il ciclo infettivo di *N. meningitidis* è caratterizzato da una discriminazione nell'espressione dei vari determinanti di patogenicità, necessaria affinché possa aversi l'innescò ed il prosieguo dell'infezione. La variazione di fase altera

casualmente l'espressione di oltre trenta componenti di superficie tra cui la capsula (SiaD), i pili (PilC1, PilC2), le proteine coinvolte nel metabolismo del lipooligosaccaride (LgtA, LgtG), le proteine della membrana esterna come le porine (PorA), le adesine/invasine (Opa, Opc), le proteine coinvolte nel metabolismo del ferro (FrpB) e, probabilmente, di altri fattori di virulenza (tossine del tipo RTX, serinaproteasi), oltre che di fattori che influenzano gli scambi genetici (Achtman, 1995; Meyer *et al.*, 1994; Saunders *et al.*, 2000). Questo meccanismo consente ad una piccola frazione della popolazione batterica di esprimere un fenotipo compatibile con un ciclo infettivo produttivo. Le basi genetiche di questa variazione dipendono dall'evoluzione di segmenti di DNA ripetuti, specialmente tratti omopolimerici, all'interno o nelle vicinanze di regioni codificanti che favoriscono l'insorgenza di mutazioni "frame-shift" ad alta frequenza e reversibili, mediante un meccanismo di scivolamento dello stampo (Bucci *et al.*, 1999; Moxon *et al.*, 1994; Richardson e Stojiljkovic, 2001; Robertson e Meyer, 1992). L'instabilità di queste ripetizioni durante la replicazione può causare uno scivolamento della cornice di lettura o alterare la distanza critica tra gli elementi di un promotore, alterando così l'espressione genica (Moxon *et al.*, 1994; Robertson e Meyer, 1992).

Il tasso di mutazione a livello delle ripetizioni omopolimeriche è generalmente alto in tutti i ceppi, tuttavia molti ceppi isolati da pazienti possono essere ipermutanti a livello di questi loci, in parte a causa di difetti genetici nel meccanismo di riparazione di basi non correttamente appaiate (Bucci *et al.*, 1999; Richardson e Stojiljkovic, 2001). La capsula polisaccaridica, ad esempio, è un importante fattore di virulenza, poiché con la sua presenza impedisce la fagocitosi, la lisi complemento-mediata e maschera le proteine della membrana esterna, rilevante bersaglio della risposta anticorpale dell'ospite, una volta che il batterio ha raggiunto il circolo ematico (Hammerschmidt *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1996); la stessa capsula però, mascherando le adesine e le invasine della superficie batterica, impedisce il processo di adesione alle cellule epiteliali (De Vries *et al.*, 1998;

Hammerschmidt *et al.*, 1996). La variazione di fase consente, quindi, di inibire l'espressione della capsula durante la fase di adesione e di invasione e di ripristinarla durante la fase batteriemia (Vogel e Frosch, 1999).

A livello molecolare la variazione di fase della capsula coinvolge una ripetizione omopolimerica di residui di citosine nella regione 5' tradotta del gene *siaD* codificante l'enzima polisialiltrasferasi: la variazione del numero delle citosine, causata da delezioni o inserzioni, determina lo scivolamento della cornice di lettura e l'interruzione prematura della traduzione, il che è responsabile della mancata espressione della capsula (Lavitola *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2000; Von Loewenich, 2001).

Un meccanismo assai simile regola lo stato di espressione dei geni *pilC1* e *pilC2*: la variazione di fase è associata a mutazioni reversibili che coinvolgono una regione codificante il peptide segnale, caratterizzata dalla ripetizione di residui di guanina. Inserzioni o delezioni all'interno della ripetizione omopolimerica determinano lo scivolamento della cornice di lettura ed il prematuro arresto della traduzione (Jonsson *et al.*, 1991).

I geni *opr* di *N. meningitidis* sono regolati in modo simile dalla presenza di una sequenza ripetuta di lunghezza variabile che influenza la traduzione dei singoli geni. Tale sequenza è costituita da una ripetizione pentamerica (CTCTT) in numero variabile ed è sita nella porzione strutturale 5' terminale dei geni, codificante la porzione idrofobica del peptide segnale (Stern *et al.*, 1987). La variazione del numero delle ripetizioni, dovuta a inserzione o delezione, determina lo scivolamento della cornice di lettura e altera conseguentemente lo stato di espressione del gene (Moxon *et al.*, 1994; Robertson e Meyer, 1992).

Studi condotti sui meccanismi molecolari alla base della variazione genetica hanno consentito di dimostrare che essenziali per la variazione antigenica e di fase in questo microorganismo sono i meccanismi di ricombinazione e riparazione del DNA. Esistono recenti evidenze che i tassi di variazione antigenica e di fase possano essere differenti tra i

vari isolati clinici di *N. meningitidis* come conseguenza di difetti genetici in tali *pathways*. È stato, infatti, dimostrato che ceppi di *N. meningitidis* di sierogruppo B, derivati dalla linea ipervirulenta ET-37, esibiscono elevate frequenze di variazione antigenica ai loci pilinici; tale fenotipo è associato a lesioni biochimiche a livello del complesso enzimatico multifunzionale RecBCD, che controlla il *pathway* primario per la ricombinazione e la riparazione post-replicativa del DNA in molte specie batteriche. Il fenotipo risultante è conseguente alla presenza di un allele difettivo, *recB*^{ET-37}, non funzionale a causa della presenza di mutazioni missenso in una regione critica per la proteina RecB (Salvatore *et al.*, 2002). Studi effettuati in parallelo in altri sistemi indicano che alleli difettivi dei geni di riparazione e ricombinazione del DNA sono riscontrabili in natura ad alta frequenza nelle popolazioni batteriche (Le Clerc *et al.*, 1996). È inoltre noto che ceppi di meningococco, per la maggior parte appartenenti a stipiti ipervirulenti, che presentano difetti genetici a carico del *mismatch-repair system* esibiscono un aumento dei tassi di mutazione spontanea ed un'aumentata frequenza di *switching* dei geni fase-variabili e sono pertanto definiti “ceppi mutatori” (Richardson e Stojiljkovic, 2001; Alexander *et al.*, 2004). In particolare, il fenotipo mutatore esibito da ceppi di meningococco di sierogruppo B appartenenti alla linea ipervirulenta ET-24 è stato associato alla presenza di alleli *mutL* e/o *mutS* difettivi geneticamente caratterizzati (Colicchio *et al.*, 2006).

Rilevanza funzionale della variazione genetica: il ciclo infettivo di

Neisseria meningitidis

Le infezioni causate dalle Neisserie patogene sono processi multifattoriali che coinvolgono una serie di interazioni, mediate da recettori, tra i batteri e le cellule bersaglio.

I batteri sono capaci di aderire alla superficie e spesso penetrare nelle cellule epiteliali e, contenuti all'interno di vacuoli fagosomali, possono passare per transitosi nei tessuti

subepiteliali. Le Neisserie patogene interagiscono fortemente con le cellule fagocitiche, come neutrofili e macrofagi, i quali sembrano fornire loro un habitat intracellulare.

Numerosi studi hanno evidenziato che i pili di tipo IV sono la *condicio sine qua non* per l'instaurarsi di una infezione *in vivo* (Hook e Holmes, 1985). Tali strutture giocano un ruolo chiave nel nasofaringe, nei primi stadi dell'infezione, in quanto responsabili della iniziale adesione "a distanza" tra il batterio e la cellula dell'epitelio mucosale nasofaringeo: meningococchi isolati dal nasofaringe sia di portatori asintomatici che di pazienti affetti da meningite presentano pili (Stephens e Mc Gee, 1981).

I pili di tipo IV sono appendici filamentose che si estendono per circa 6µm dalla superficie cellulare, le cui subunità elementari sono le proteine pilE, denominate "piline" (Stephens *et al.*, 1985).

La pilina è un polipeptide di 18-22 kDa che viene sintetizzata come proteina precursore, con una sequenza segnale di secrezione non convenzionale, e subisce un caratteristico *processing* ad opera della prepilina peptidasi/transmetilasi, PilD, che porta alla formazione della subunità pilinica matura (Strom *et al.*, 1993), la quale, successivamente, subisce modificazioni post-traduzionali (fosforilazione e/o glicosilazione) che possono influenzare il riconoscimento del recettore (Forest *et al.*, 1999; Jennings *et al.*, 1998).

Le subunità piliniche polimerizzano in un'elica cilindrica in cui le code piliniche idrofobiche si impacchettano nel core cilindrico a formare una struttura *coiled-coil* che probabilmente è responsabile della forza tensile delle fibre, mentre le teste globulari piliniche sono rivolte verso l'esterno a formare la superficie del cilindro (Scheuerpflug *et al.*, 1999).

Le proteine pilE, in realtà, non sono in grado di interagire direttamente con la cellula ospite: l'adesione pilus-mediata si realizza ad opera di una grossa proteina di 110 kDa, pilC che si associa agli aggregati di pilina all'estremo libero del pilus, conferendo al pilus stesso una specifica capacità di adesione (Nassif *et al.*, 1994).

Nel gonococco si trovano due proteine pilC: pilC1 e pilC2, entrambe con proprietà adesive; nel meningococco, invece, possono essere presenti o entrambe le forme o solo una di esse cioè pil C1, che è comunque quella essenziale per l'adesione pilus-mediata (Nassif *et al.*, 1994). Mutanti pilC2+/C1- mostrano, infatti, una assai ridotta capacità invasiva delle cellule bersaglio (Rahman *et al.*, 1997). La proteina pilC1 presenta un dominio di legame che probabilmente è implicato nell'interazione con un recettore del pilus sito a livello della membrana luminare della cellula epiteliale ed identificato nella proteina regolatoria del complemento CD46, o cofattore proteico di membrana (MCP), in realtà espresso su quasi tutte le cellule umane (Kallstrom *et al.*, 1997). L'interazione dei pili sembra, quindi, essere assolutamente specifica per le cellule umane: i pili rappresenterebbero, pertanto, il principale determinante del tropismo di specie delle Neisserie.

L'adesione pilus-mediata innesca, nella cellula ospite, una serie di risposte che determinano riarrangiamenti del citoscheletro e modificazioni della membrana plasmatica indispensabili per la formazione delle cosiddette placche corticali di adesione, strutture simili all' "invasoma" che si osserva in seguito all'interazione dei pili di tipo IV con le cellule ospiti, nell'infezione da *Bartonella henselae*, agente eziologico della febbre da graffio di gatto (Dehio *et al.*, 1997).

È interessante sottolineare che se da un lato le strutture piliari sono necessarie al processo di adesione agli epiteli, dall'altro esse ne ostacolano la successiva invasione (Nassif *et al.*, 1999).

All'iniziale fase di adesione pilus-mediata segue, pertanto, una seconda fase caratterizzata dalla perdita dei pili e mediata da proteine della membrana esterna del batterio responsabili di un attacco più diretto ed esteso del meningococco alla cellula epiteliale. Tra i determinanti di virulenza della membrana esterna, un ruolo di primo piano spetta alle proteine dell'Opacità (così dette perché responsabili dell'aspetto opaco delle colonie)

codificate dalla famiglia dei geni *opa*. Il repertorio specifico dei geni *opa* è variabile: i ceppi di gonococco generalmente possiedono circa 11 loci *opa*, mentre i ceppi di meningococco hanno in genere 4-5 loci *opa* (Dehio *et al.*, 2000). Tutti i geni *opa* sequenziati presentano al 5' una sequenza ripetuta in tandem [CTCTT]_n che causa variazione di fase ad alta frequenza. Come risultato, un determinato batterio può reversibilmente esprimere nessuna, una o diverse proteine Opa (Stern *et al.*, 1987). Inoltre, il trasferimento orizzontale di geni promuove la formazione di loci *opa* ricombinanti ibridi. Le proteine Opa possiedono 8 foglietti β transmembrana (relativamente conservati) e 4 *loops* (tre variabili ed uno conservato) esposti in superficie (Bhat *et al.*, 1991). È sperimentalmente dimostrato che linee cellulari differenti interagiscono con particolari Opa, indicando che l'espressione delle proteine Opa è un determinante del tropismo cellulare (Belland *et al.*, 1992).

Recentemente sono state identificate due ampie classi di recettori per le proteine Opa che hanno permesso di migliorare la comprensione dei meccanismi molecolari dell'adesione e dell'invasione Opa-mediate (Virji *et al.*, 1996; De Vries *et al.*, 1998).

La prima classe di recettori Opa è rappresentata dai proteoglicani eparansolfato (HSPGs). I recettori HSPGs legano Opa che possiedono *loops* esposti in superficie ricchi di residui aminoacidici carichi positivamente, come la proteina Opa30 di gonococco che media un efficiente legame ed invasione delle cellule congiuntivali.

La seconda classe di recettori Opa è rappresentata dalle proteine CD66-correlate, codificate da diversi geni, e variabilmente espresse su differenti tipi cellulari. Queste proteine sono caratterizzate da alta affinità e variabile specificità di legame per le proteine Opa.

Il legame delle Opa ai loro specifici recettori innesca una serie di segnali che conducono all'invasione dei batteri attraverso vari *pathway* e probabilmente anche a differenti destini intracellulari e/o esiti di infezione.

Anche le proteine di classe V della membrana esterna, rinominate Opc per la debole omologia con le proteine Opa, sono coinvolte nel processo di adesione. Il gene *opc* è presente in molti ma non in tutti i ceppi di meningococco ed è associato con la virulenza. L'espressione di *opc* in meningococchi non capsulati conferisce ai batteri la capacità di aderire e di invadere le cellule endoteliali indipendentemente dalla presenza di Opa e pili (Virji *et al.*, 1992b).

L'interazione delle adesine/invasine del batterio con i relativi recettori della cellula epiteliale stabilisce, così, un “cross-talk” tra i batteri e la cellula bersaglio in seguito al quale essi vengono inglobati all'interno di vescicole e traslocati alla membrana basale per essere poi esocitati nella sottomucosa ad opera di un processo di transitosi. (Merz e So, 2000; Nassif *et al.*, 1999) (Fig. 2)

In tale stadio del processo infettivo un ruolo critico è giocato dalle porine PorA e PorB. È stato dimostrato che tali proteine sono in grado di traslocare spontaneamente nella membrana plasmatica della cellula ospite dove funzionano da canali ionici voltaggio-dipendenti determinando una transitoria variazione del potenziale di membrana con conseguente alterazione dei segnali cellulari (Ulmer *et al.*, 1992).

Sebbene l'esatto ruolo delle porine nel processo infettivo di *N. meningitidis* non sia ancora del tutto chiaro, è stato osservato che le porine PorA e PorB sono capaci di “nucleare” le molecole di actina, suggerendo, quindi, un loro possibile coinvolgimento nella traslocazione citoplasmatica dei batteri infettanti (Wen *et al.*, 2000).

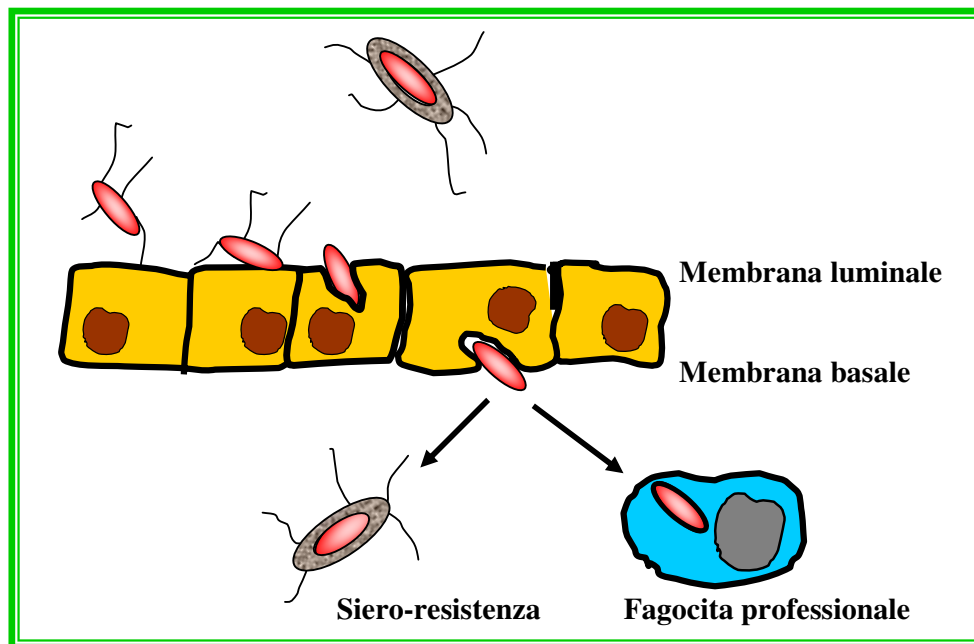


Figura 2. Ciclo infettivo di *Neisseria meningitidis*

N. meningitidis è capace di aderire alla superficie mucosale grazie alla presenza dei pili; successivamente il batterio penetra nelle cellule epiteliali e, contenuto all'interno di vacuoli fagosomali, può passare per transitosi nei tessuti subepiteliali.

La colonizzazione della mucosa epiteliale da parte del meningococco può causare una attivazione delle difese immunitarie dell'ospite che si manifesta nella produzione di IgA secretorie, e nella risposta infiammatoria, con reclutamento ed attivazione dei fagociti professionali. Il ruolo protettivo delle IgA secretorie sembra confermato dal fatto che nella “zona della meningite” dell'Africa sub-sahariana l'incidenza della malattia meningococcica aumenta bruscamente verso la fine della stagione secca e polverosa e si riduce con l'inizio della stagione delle piogge. È stato ipotizzato che la presenza della polvere interferisca con la secrezione locale di IgA a livello del nasofaringe riducendo le difese dell'ospite nei confronti del meningococco.

N. meningitidis è comunque in grado di eludere entrambi i meccanismi di difesa messi in atto dall'ospite.

L'attacco da parte delle IgA secretorie, prodotte dalle cellule mucosali del nasofaringe, è, infatti, neutralizzato mediante la produzione di IgA proteasi, un altro importante fattore di virulenza di *N. meningitidis*. Si tratta di una famiglia di endoproteinasi antigenicamente differenti che attaccano specificamente le immunoglobuline A1 dell'ospite umano (Halter *et al.*, 1994).

A differenza dei pili e delle proteine Opa, le IgA proteasi sono codificate da singole copie geniche (*iga*) altamente conservate; gli scambi orizzontali di sequenze geniche *iga* si traducono nell'esistenza di numerose IgA proteasi antigenicamente differenti in *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* (Morelli *et al.*, 1994).

Le IgA proteasi, oltre a neutralizzare le IgA secretorie, prodotte dalle cellule mucosali svolgono una seconda importante funzione nel processo patogenetico. Numerose sono, infatti, le evidenze che supportano l'ipotesi secondo cui le IgA proteasi attacchino la principale glicoproteina strutturale di membrana dei lisosomi, LAMP1 (*lysosome-associated membrane protein*), la cui degradazione promuoverebbe la sopravvivenza del batterio all'interno delle cellule epiteliali infettate (Lin *et al.*, 1997; Ayala *et al.*, 1998). L'esatto ruolo che LAMP1 ricopre nei lisosomi non è ancora del tutto chiaro. È stato comunque ipotizzato che essa possa avere la funzione di proteggere la membrana lisosomale dalla digestione da parte degli enzimi idrolitici presenti in tale compartimento (Fukuda, 1991; Kornfeld e Mellman, 1989). Se così fosse, la riduzione dei livelli di LAMP1, osservata nelle cellule infettate, avrebbe un effetto negativo sui lisosomi, riducendone stabilità e numero (Ayala *et al.*, 1998).

La glicoproteina LAMP1 è costituita da una breve coda citoplasmatica, da un singolo dominio transmembrana e da due domini luminali fortemente glicosilati, separati da un dominio ricco in prolina IgA1-simile con potenziali siti di taglio per le IgA proteasi. È stato osservato che, *in vitro*, l'azione delle IgA proteasi su LAMP1 è elevata a pH 7.5,

intermedia a pH 6.5 e bassa a pH 5.0, suggerendo che tali enzimi siano, di fatto, poco attivi nell'ambiente acido del lume lisosomale (Ayala *et al.*, 1998).

È interessante, quindi, capire come le IgA proteasi raggiungano LAMP1 e la degradino, abbassandone il livello nelle cellule infettate. La maggior parte delle glicoproteine LAMP1 neosintetizzate fluisce dall'apparato di Golgi direttamente ai lisosomi; un'altra frazione (5-20%, a seconda del tipo cellulare), invece, dall'apparato di Golgi raggiunge la membrana citoplasmatica per poi essere endocitata ed indirizzata ai lisosomi. Questa frazione di proteine LAMP1 può essere attaccata dalle IgA proteasi secrete dai batteri aderenti alla superficie cellulare, essendo il dominio ricco in prolina IgA1-simile esposto sulla faccia esterna della membrana plasmatica, dove, del resto, è presente un pH ottimale per l'attività di tali enzimi (Ayala *et al.*, 2002; Ayala *et al.*, 1998).

Recentemente è stato identificato un ulteriore possibile percorso attraverso cui LAMP1 diventa accessibile alle IgA proteasi batteriche. Nelle cellule epiteliali, l'adesione dei pili di tipo IV alla membrana plasmatica, per mezzo dei recettori CD46, determina un rilascio di calcio dai depositi intracellulari. Il conseguente incremento della concentrazione del calcio nel citoplasma di tali cellule innesca l'esocitosi dei lisosomi e la conseguente esposizione di LAMP1 all'attacco delle IgA proteasi presenti nell'ambiente extracellulare. L'evento esocitotico causa il rilascio del contenuto dei lisosomi sulla superficie cellulare, la quale, comunque, non viene danneggiata poiché gli enzimi litici lisosomali hanno un basso optimum di pH e la loro attività è, dunque, ridotta agli elevati valori di pH in cui si vengono, invece, a trovare in seguito al processo esocitotico (Kallstrom *et al.*, 1998; Ayala *et al.*, 2001).

Superata la barriera fisica dell'epitelio ed invaso il circolo ematico, *N. meningitidis* è in grado di mascherare i maggiori determinanti antigenici di superficie grazie alla presenza della capsula la cui componente polisialica determina la resistenza nei confronti della fagocitosi e previene l'attivazione del complemento tramite la via alternativa. L'acido

sialico, inoltre, è un normale costituente delle membrane neurali umane: viene, pertanto, mantenuto uno stato di immunotolleranza verso tale componente capsulare (Jarvis, 1995; Hammerschmidt *et al.*, 1994).

L'espressione della capsula dipende dalla presenza e dall'espressione di geni per la biosintesi, la modificazione ed il trasporto, localizzati rispettivamente nelle regioni A, B e C, del locus *cps* del genoma di meningococco. I geni della regione A determinano la composizione biochimica della capsula e quindi il sierogruppo. Nei meningococchi che esprimono capsule contenenti acido sialico (sierogruppi B, C, W-135 ed Y), la regione A comprende i geni *siaA*, *siaB* e *siaC*, necessari per la sintesi di acido sialico attivato (CMP-Neu5Ac), ed il gene sierogruppo-specifico *siaD* codificante la polisialiltransferasi (Frosch *et al.*, 1989) (Fig. 3). Studi *in vitro* hanno dimostrato che lo scivolamento della cornice di lettura e le inserzioni in questa regione dell'elemento mobile S1301 provocano l'inattivazione reversibile dell'espressione della capsula di sierogruppo B, che può favorire la colonizzazione del nasofaringe (Hammerschmidt *et al.*, 1996).

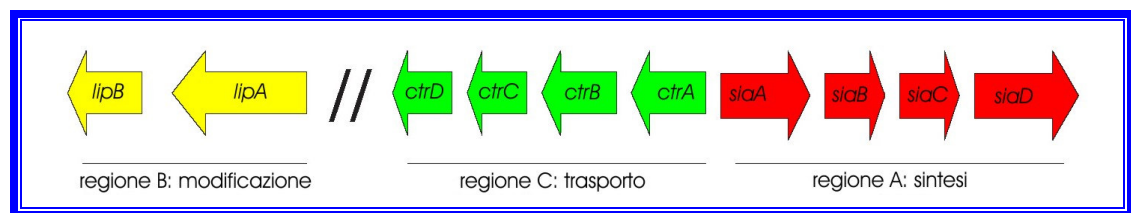


Figura 3. Descrizione schematica del locus della capsula (*cps*) di *N. meningitidis*

I geni per la biosintesi, la modificazione ed il trasporto della capsula sono localizzati rispettivamente nelle regioni A, B e C, del locus *cps* del genoma di meningococco. I geni della regione A determinano la composizione biochimica della capsula. Nei meningococchi che esprimono capsule contenenti acido sialico la regione A comprende i geni *siaA*, *siaB* e *siaC*, necessari per la sintesi di acido sialico attivato, ed il gene sierogruppo-specifico *siaD* codificante la polisialiltransferasi.

La variazione di fase della capsula ha importanti ripercussioni patogenetiche: la sua assenza nelle fasi iniziali del processo infettivo favorisce l'interazione Opa- ed Opc-

mediata dei meningococchi con le cellule bersaglio che è fondamentale per l'invasione cellulare, mentre la sua presenza negli stadi successivi all'invasione protegge i batteri dalle risposte immunitarie specifiche e aspecifiche dell'ospite, favorendo la persistenza dell'infezione.

Durante la fase di infezione un altro componente di superficie che gioca un ruolo chiave nel regolare l'ingresso del batterio nella cellula ospite è rappresentato dal lipooligosaccaride. La membrana esterna delle Neisserie contiene un lipopolisaccaride (LPS) costituito da brevi catene di zuccheri, privo di alcune catene ripetitive dell'antigene O, e perciò definito lipooligosaccaride (LOS). Ne sono stati individuati sei sierotipi in *N. gonorrhoeae* e 12 in *N. meningitidis*. Il lipooligosaccaride è composto da glucosio, galattosio, acido 3-cheto-2-desossioctanoico, glucosamina, galattosamina ed etanolamina in proporzioni differenti in base al sierotipo. La catena oligosaccaridica composta da 5 a 10 unità monosaccaridiche è legata al lipide A mediante l'acido 3-deossi-D-manno-ottulosonico (Pavliak *et al.*, 1993).

Il LOS delle Neisserie rientra nelle strutture della superficie batterica soggette a variazione antigenica.

L'enorme eterogeneità strutturale del LOS è dimostrata sia *in vitro* che *in vivo*. Nei portatori sani del meningococco, la maggior parte (70%) dei batteri isolati dal nasofaringe non sono capsulati ed esprimono una forma breve di LOS (Broome, 1986), mentre nei soggetti malati, il 97% degli isolati da sangue e CFS sono capsulati e presentano una forma lunga di LOS (Jones *et al.*, 1992). Allo stesso modo, i batteri isolati precocemente durante le infezioni gonococciche hanno una forma breve di LOS, mentre dopo lo sviluppo della risposta infiammatoria predomina un fenotipo batterico provvisto di una forma lunga di LOS (Schneider *et al.*, 1991).

La differenza principale tra la forma lunga e la forma breve del LOS è la presenza di residui di acido sialico che vengono aggiunti, nella forma lunga del LOS, ad opera di una

sialiltransferasi codificata dal batterio. Poiché solo alcune varianti del LOS possono subire tale modificazione e la sintesi di queste varianti è controllata da enzimi fase-variabili, la “sialilazione” del LOS è un fenotipo variabile (Mandrell e Apicella, 1993; Van Putten, 1993).

La rilevanza biologica di tale sialilazione variabile sta nel fatto che i residui di acido sialico, presenti oltre che nel LOS anche nella capsula, aumentano la carica negativa della superficie del batterio e, se da un lato conferiscono resistenza al complemento ed alla fagocitosi, dall'altro inibiscono l'adesione e l'invasione Opa- ed Opc-mediata delle cellule ospiti. Al contrario, questi carboidrati non inibiscono l'adesione mediata dai pili di tipo IV, probabilmente perché i pili si estendono abbastanza lontano dalla superficie cellulare batterica così che la repulsione elettrostatica tra residui di acido sialico del batterio e la superficie della cellula ospite è trascurabile. Così, una bassa sialilazione permette al batterio l'adesione alle cellule epiteliali e la successiva invasione, ma lo rendono suscettibile alle difese immunitarie dell'ospite. Invece, un'elevata sialilazione rende il batterio incapace di penetrare nella cellula ospite, ma lo rende resistente alla fagocitosi e alla lisi complemento-mediata.

È comunque doveroso sottolineare che alcuni stipti particolarmente virulenti di meningococco sono capaci di sopravvivere all'interno dei fagociti. Infatti, una volta inglobati dai fagociti professionali, essi risiedono in fagosomi, i quali possono andare incontro alla fusione con i lisosomi dando origine ai fagolisosomi, a meno che tale fusione non sia inibita in seguito alla inserzione di canali ionici batterici nella membrana delle vescicole lisosomali (Weel e Van Putten, 1991). Nel fagolisosoma i batteri si trovano in un ambiente estremamente ostile, ricco di meccanismi neutralizzanti ossidativi, cui però i meningococchi abilmente riescono ad opporsi mediante svariati meccanismi che consentono loro di essere dei potenziali microrganismi intracellulari facoltativi.

È noto in letteratura che tali meccanismi includono l'incremento del consumo di ossigeno (Cohen e Cooney, 1984; Britigan *et al.*, 1988), la produzione di elevati livelli di catalasi (Dunn *et al.*, 2003; Archibald *et al.*, 1986) ed il passaggio alla crescita anaerobica, con conseguente utilizzo dei nitriti come accettori finali nella catena di trasporto degli elettroni (Hasset e Cohen, 1989). Solo recentemente, inoltre, studi *in vitro* hanno permesso di dimostrare che la capsula, che pure influenza negativamente i processi di adesione e di internalizzazione del meningococco, è, invece, fondamentale per la sopravvivenza intracellulare di questo microrganismo, in quanto incrementa la resistenza del batterio ai peptici cationici antimicrobici (CAMPs), importanti componenti delle difese immunitarie innate dell'ospite nei confronti delle infezioni microbiche (Spinosa *et al.*, 2007)

All'interno dei fagosomi i batteri riescono, pertanto, a sopravvivere in attesa di una lisi citotossica o di un rilascio esocitotico da parte del fagocita, che consenta loro di guadagnare il circolo ematico con i conseguenti ulteriori adattamenti ed *escamotage*, necessari al batterio per la sopravvivenza all'interno dell'ospite.

Patogenesi e fisiopatologia della malattia meningococcica

La patogenesi della malattia meningococcica è correlata all'espressione, in momenti successivi, di differenti fattori di virulenza batterici che consentono ai germi di superare i meccanismi di difesa dell'ospite e di raggiungere, invadere e replicarsi nel liquor. Questi eventi patogenetici includono: colonizzazione nasofaringea, invasione delle cellule dell'epitelio nasofaringeo, invasione del circolo ematico, batteriemia con sopravvivenza intravascolare, superamento della barriera ematoencefalica e interessamento del liquor, sopravvivenza e replicazione nello spazio subaracnoideo.

La porta d'ingresso dei meningococchi è il nasofaringe; nella maggior parte dei casi l'infezione nasofaringea è subclinica, ma si possono manifestare lievi sintomi prodromici

costituiti da odinofagia, rinorrea, tosse, cefalea e congiuntivite. Poco dopo l'adesione alla mucosa nasofaringea, i meningococchi provvisti di capsula vengono trasportati attraverso le cellule epiteliali non ciliate all'interno di grandi vacuoli fagocitari, delimitati da membrana. Entro 24 ore i microrganismi possono venire osservati a livello della sottomucosa, a stretto contatto con le cellule immunitarie locali e con i vasi sanguigni. Dopo la penetrazione mucosale e presumibilmente dopo una fase di adattamento, i batteri guadagnano l'accesso al circolo. A livello del compartimento vascolare i meningococchi invasori possono o venire uccisi dall'azione combinata degli anticorpi battericidi del siero, del complemento e delle cellule fagocitarie, o moltiplicarsi dando inizio alla fase batteriemia. A tal fine essi devono essere in grado di sfuggire alle difese immunitarie dell'ospite: questa caratteristica dipende largamente dall'espressione del polisaccaride capsulare.

I sintomi e segni della malattia sistemica si manifestano contemporaneamente alla meningococcemia e di solito precedono i sintomi della meningite di 24-48 ore. Le manifestazioni cliniche variano da sintomi minori di batteriemia transitoria fino alla malattia fulminante della durata di poche ore. L'esordio è di solito improvviso, con febbre, brividi, nausea, vomito, eruzione cutanea, mialgie e artralgie. La febbre, di solito tra 39 e 41°C, è praticamente universale, anche se alcuni pazienti con malattia fulminante possono essere afebrili o anche ipotermici. L'aspetto più caratteristico è l'eruzione cutanea che si sviluppa in tre quarti dei pazienti e può essere maculopapulare, petecchiale o ecchimotica. L'eruzione maculopapulare appare subito dopo l'esordio della malattia; le lesioni sono di colore rosa, del diametro di 2-10mm, rade e distribuite sul tronco e sulle estremità. Spesso a livello del centro della macula compare una petecchia. L'eruzione può progredire nelle ore successive fino a diventare emorragica, mentre le condizioni generali del paziente si deteriorano. Le lesioni petecchiali hanno le dimensioni di 1-2mm di diametro e sono distribuite principalmente a livello del tronco e delle estremità inferiori, ma anche a livello

del volto, del palato e delle congiuntive. Nei casi relativamente gravi le petecchie possono diventare confluenti e formare delle bolle emorragiche, con estese ulcerazioni.

La meningococcemia fulminante, precedentemente chiamata sindrome di Waterhouse-Friderichsen, si distingue dalle forme più lievi per la rapida progressione e l'estrema aggressività. Si verifica nel 10-20% dei pazienti con malattia meningococcica ed è caratterizzata dallo sviluppo di shock, coagulazione intravascolare disseminata e insufficienza multiorganica. L'esordio è rapido; in alcune ore si sviluppano le lesioni purpuriche, l'ipotensione e la vasocostrizione periferica con estremità fredde e cianotiche. Lo stato di coscienza è variabile, ma molti pazienti rimangono vigili nonostante l'ipotensione. Le lesioni purpuriche aumentano rapidamente di dimensione e interessano la cute, le mucose e organi interni come i muscoli scheletrici, le ghiandole surrenali e talvolta l'ipofisi. L'insufficienza miocardica, che contribuisce alla genesi dello shock, è segnalata dalla compromessa contrattilità miocardica, dal ridotto indice cardiaco e dai livelli sierici elevati di creatinina fosfochinasi. Nonostante il trattamento più adeguato in unità di cura intensiva, il 50-60% dei pazienti muore, di solito a causa di insufficienza cardiaca o respiratoria. I pazienti che guariscono possono presentare gravi lesioni cutanee oppure mutilazioni di parti degli arti, a causa della gangrena.

Anche se l'infezione meningococcica sistemica è principalmente una malattia batteriemia, *N. meningitidis* dimostra un marcato tropismo per le meningi e per la cute e, in minor grado, per la sinovia, per le superfici sierose e per le ghiandole surrenali. La presentazione clinica più comune della malattia meningococcica è, infatti, rappresentata dall'associazione della meningite e della setticemia.

Sebbene la sede e il meccanismo dell'invasione meningea da parte di *N. meningitidis* non sia stato ancora chiarito, i meningococchi aderiscono prontamente all'endotelio cerebrovascolare e penetrano attraverso la parete dei vasi sanguigni. È possibile che la meningite sia secondaria a una batteriemia prolungata che deve essere di intensità e durata

sufficienti oppure che l'invasione del SNC sia mediata dall'adesione a punti chiave della barriera ematoencefalica come potrebbero essere i plessi corioidei, caratterizzati da elevato flusso ematico e presenza di capillari fenestrati. In alternativa, i microrganismi potrebbero essere trasportati all'interno dei macrofagi o di altre cellule fagocitiche che entrano nel SNC attraverso le normali vie di transito cellulare. Quando i batteri hanno attraversato la barriera ematoencefalica e sono penetrati all'interno del SNC, i meccanismi di difesa umorali dell'ospite, soprattutto quelli che dipendono dalle immunoglobuline e dal complemento, sono praticamente assenti e ciò avvantaggia molto l'agente patogeno. La meningite batterica rappresenta, dunque, un'infezione in una sede in cui i meccanismi di difesa dell'ospite sono ridotti.

L'ingresso e la replicazione dei batteri nel liquor sono seguiti da un'inflammatione dello spazio subaracnoideo, indotta da alcuni costituenti batterici. Benché la capsula sia cruciale per la sopravvivenza dell'agente patogeno nel torrente ematico e nello spazio subaracnoideo, i polisaccaridi capsulari non hanno un'importante attività infiammatoria. Studi sperimentali hanno dimostrato che la struttura responsabile dell'inflammatione nello spazio subaracnoideo sia l'LPS (Brandtzaeg *et al.*, 2001). Infatti gli aumentati livelli di LPS nel liquor inducono la produzione locale di mediatori infiammatori quali il fattore di necrosi tumorale (TNF) e l'interleuchina 1 (IL-1). Queste citochine proinfiammatorie sono entrambe in grado di indurre l'inflammatione dello spazio subaracnoideo e sembrano agire in modo sinergico. Più incerto è il ruolo di altre citochine infiammatorie nell'induzione dell'inflammatione dello spazio subaracnoideo. Benché durante le meningiti batteriche le concentrazioni liquorali di interleuchina 6 (IL-6) e di fattore attivante le piastrine (PAF) risultino aumentate, non è noto quale sia il preciso contributo di queste citochine allo sviluppo del processo infiammatorio (Moller *et al.*, 2005).

Una delle principali conseguenze fisiopatologiche della meningite batterica è l'aumento della permeabilità della barriera ematoencefalica che causa edema cerebrale.

I classici sintomi di esordio della meningite batterica negli adulti sono cefalea, febbre e rigidità nucale, spesso con segni di disfunzione cerebrale. Sono comuni nausea, vomito, sudorazione profusa, debolezza, mialgie e fotofobia. L'interessamento cerebrale si manifesta inizialmente con confusione mentale, delirium o diminuzione del livello di coscienza, che va dal torpore al coma. Le paralisi dei nervi cranici, che coinvolgono principalmente il quarto, il sesto e il settimo, si riscontrano nel 10-20% dei casi e sono occasionalmente accompagnate da deficit neurologici focali, quali alterazioni del campo visivo, afasia ed emiparesi. Crisi epilettiche si manifestano in circa il 40% dei casi.

La caratteristica peculiare della meningite batterica è la presenza di essudato nello spazio subaracnoideo. L'essudato purulento si accumula nelle cisterne della base e a livello delle convessità degli emisferi cerebrali e, in assenza di ostruzioni, si diffonde lungo il midollo spinale, le guaine dei nervi e il sistema ventricolare. Nelle fasi iniziali della malattia l'esame microscopico dell'essudato subaracnoideo rivela la presenza di un elevato numero di neutrofili e batteri. Entro 2 o 3 giorni dall'infezione compaiono i segni di infiammazione a livello delle pareti dei vasi subaracnoidei di piccolo e medio calibro. L'infiltrazione subintimale delle arterie da parte di linfociti e neutrofili rappresenta un evento caratteristico dell'infezione delle meningi. Le vene meningehe si distendono e sviluppano un'infezione della parete che può essere complicata da necrosi focali o formazione di trombi murali nel lume. A partire dalla fine della prima settimana di malattia si verifica un cambiamento nella composizione cellulare dell'essudato subaracnoideo. I neutrofili vanno incontro a degenerazione e vengono rimossi dai macrofagi che derivano dagli istiociti meningei. I nuclei dei neuroni e delle cellule gliali affette diventano raggrinziti, picnotici e ipercromici. Il blocco delle normali vie di flusso della circolazione liquorale può dare origine a un idrocefalo non comunicante o ostruttivo. L'accumulo di essudato fibrinoso-purulento può interferire con l'assorbimento del liquor attraverso i villi aracnoidei.

L'edema cerebrale diffuso e l'aumento della pressione intracranica possono provocare pericolose erniazioni cerebrali (Tzeng e Stephens, 2000).

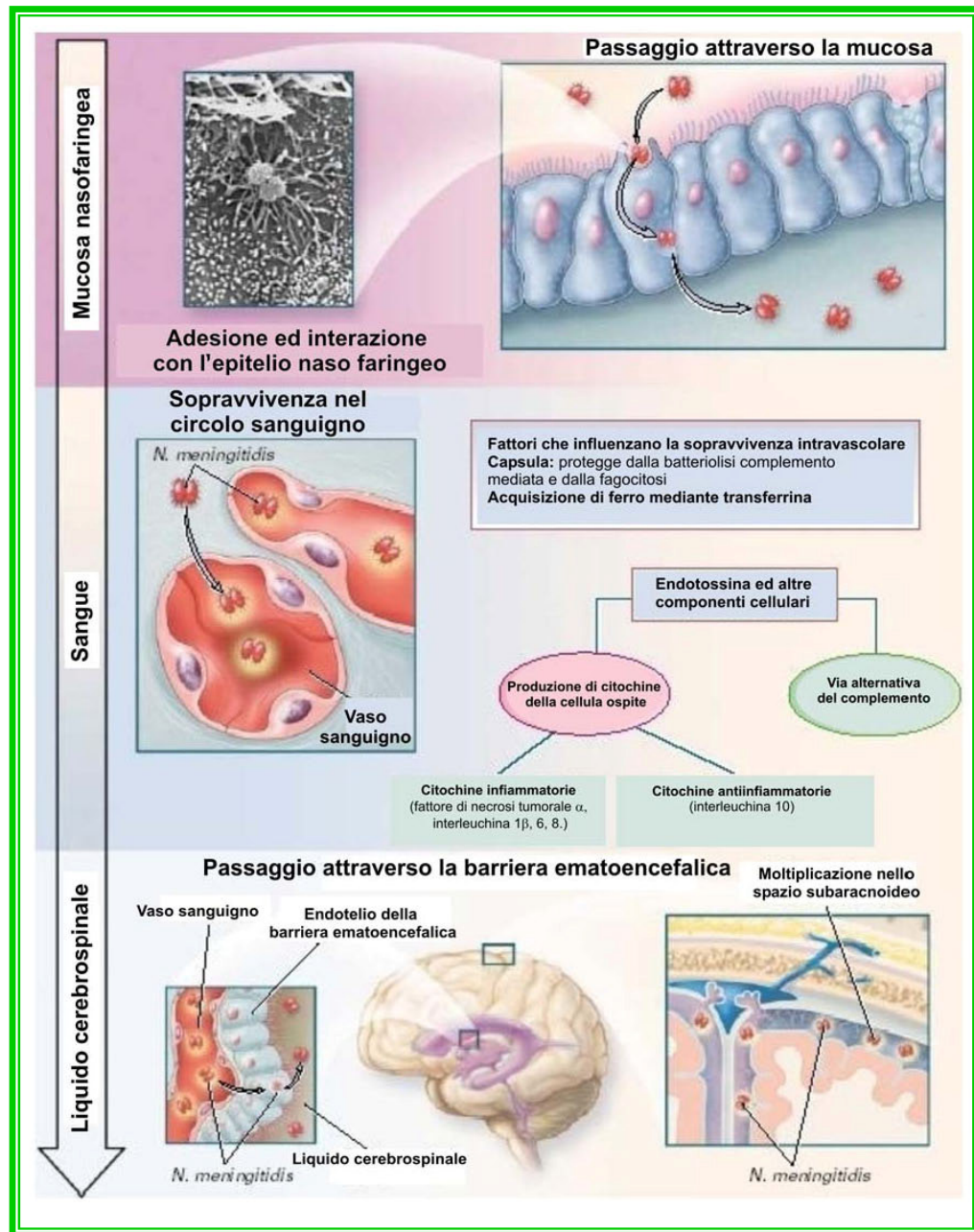


Figura 4. Principali eventi del processo invasivo di *N. meningitidis*

Dopo la colonizzazione del nasofaringe, il batterio attraversa l'epitelio nasofaringeo tramite un processo di endocitosi ed invade il torrente circolatorio. Nel sangue il batterio prolifera e si adatta all'ambiente dell'ospite. La risposta all'infezione varia da manifestazioni cliniche benigne, a manifestazioni estreme e fatali (meningococcemia). Nelle forme più severe il batterio attraversa la barriera ematoencefalica e causa infiammazione meningea.

Epidemiologia, prevenzione e controllo dell'infezione da meningococco

L'ambiente naturale del meningococco è la gola dell'uomo, dove il microrganismo si impianta il più delle volte senza provocare alcun sintomo. La trasmissione interpersonale avviene con l'inalazione di goccioline provenienti da secrezioni orofaringee infette. La principale sorgente di infezione è rappresentata dai portatori; raramente la malattia è trasmessa da un soggetto malato. In periodi non epidemici il numero di portatori sani nella popolazione è piuttosto elevato (10-20%). Questo stato di portatore persiste di solito per pochi mesi, ma la condizione di portatore cronico non è rara; tale condizione rappresenta la principale riserva di meningococchi ed aumenta le resistenze immunitarie dell'ospite, in quanto l'acquisizione del microrganismo a livello del nasofaringe è seguita da un aumento del titolo anticorpale specifico per il ceppo colonizzante (Caugant, 1998, Caugant *et al.*, 2007).

Solo raramente, tuttavia, la colonizzazione progredisce fino alla malattia, perché anticorpi specifici e complemento lisano i microrganismi nel sangue e forniscono pertanto una barriera efficace alla disseminazione. L'osservazione e lo studio delle epidemie indica come la malattia meningococcica invasiva si verifichi con maggiore probabilità entro pochi giorni dall'acquisizione di un nuovo ceppo, cioè prima che si siano sviluppati gli anticorpi sierici specifici.

N. meningitidis può esprimere la sua potenzialità patogena sotto forma di epidemie, di casi sporadici endemici e di epidemie circoscritte.

La meningite meningococcica risulta endemica presentando, a livello mondiale, una incidenza di circa 2 casi ogni 100 000 persone per anno. Più del 50% dei casi si verifica fra i bambini di età inferiore ai 5 anni, con il massimo di incidenza nel primo anno di vita. Tuttavia, durante i primi tre mesi gli anticorpi materni sono ancora sufficienti per esercitare una funzione protettiva. La malattia endemica viene causata prevalentemente da microrganismi di gruppo B di diverso sierotipo.

Le epidemie si verificano più frequentemente nei settori più poveri della popolazione, dove sono comuni l'affollamento e l'inadeguatezza delle strutture sanitarie. I meningococchi di sierogruppo A sono la causa principale delle epidemie che vengono descritte regolarmente in Sud America, Cina, Nepal, India, Pakistan, Bhutan, ed in Africa, soprattutto nella fascia sub-sahariana (la cosiddetta “zona della meningite” ossia la zona subito a sud del deserto del Sahara) (Fig. 5).

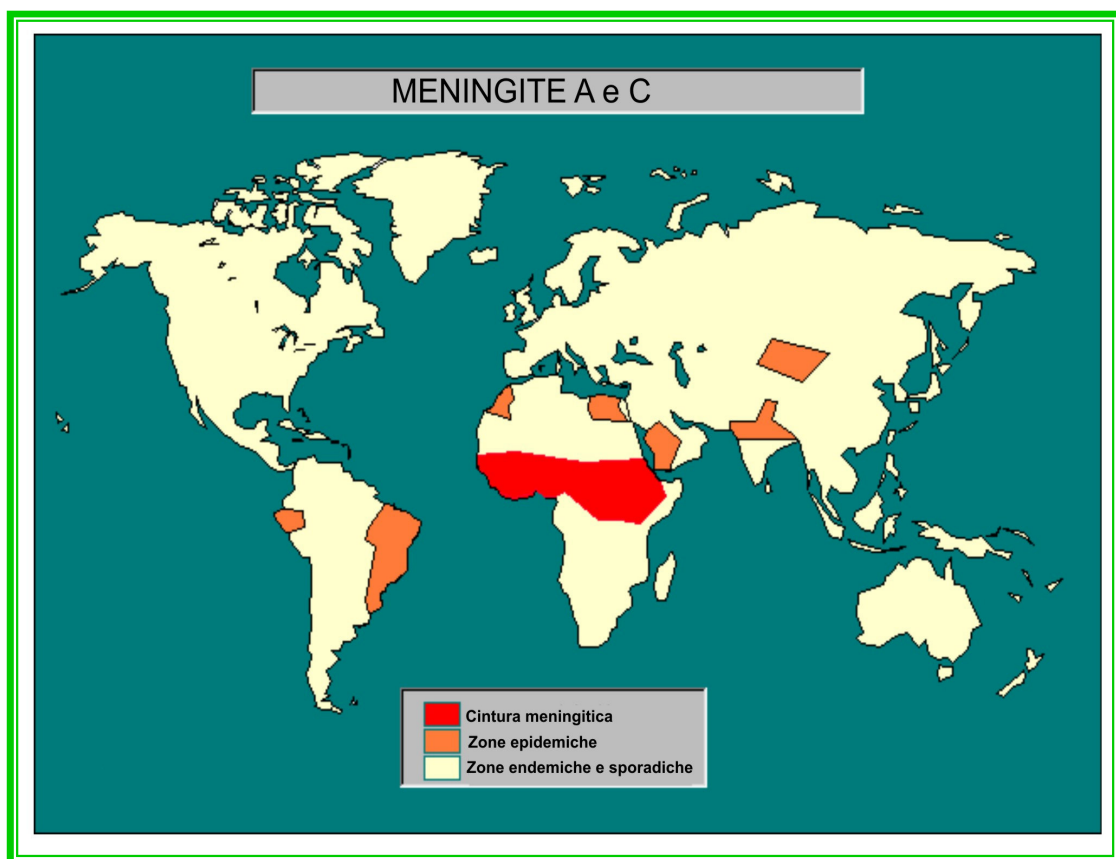


Figura 5. La meningite meningococcica nel mondo

In rosso è evidenziata l'area geografica maggiormente colpita da epidemie causate da ceppi di *N. meningitidis* di sierogruppo A (fascia sub-sahariana); in arancio sono mostrate le restanti regioni colpite da epidemie.

Nei paesi meno sviluppati l'epidemia si diffonde rapidamente, raggiunge alti tassi d'incidenza, e coinvolge grandi strati di popolazione. In queste regioni l'infezione epidemica rappresenta una delle principali cause di morbidità e mortalità, causando oltre 10 000 morti per singola insorgenza di malattia. I fattori scatenanti la malattia meningococcica sono scarsamente conosciuti, sebbene caratteristiche genetiche del batterio e dell'ospite, oltre a fattori ambientali, siano implicati nella patogenesi.

Le epidemie si manifestano prevalentemente durante l'inverno e l'inizio della primavera e sono favorite dalla presenza nelle comunità di un vasto numero di individui non immuni, dal sovraffollamento e dallo stress.

I ceppi di sierogruppo B, invece, predominano nei Paesi industrializzati e sono maggiormente associati a casi sporadici di malattie o a epidemie localizzate che possono verificarsi nelle collettività chiuse come scuole, prigioni, caserme, ospedali.

Lo sviluppo della malattia meningococcica dipende, nella maggior parte dei casi, dallo stato immunitario dell'ospite. L'immunità è, di solito, tipo-specifica e si sviluppa nella maggior parte delle persone entro i primi due decenni di vita. Anticorpi antimeningococco, quindi, sono presenti nella maggior parte dei casi e giocano un ruolo importante nella prevenzione della meningite meningococcica. La malattia meningococcica invasiva si realizza, infatti, quasi esclusivamente in soggetti che non possiedono livelli protettivi di anticorpi battericidi nei confronti del ceppo in causa.

I neonati sono protetti dalla malattia meningococcica grazie agli anticorpi materni trasferiti loro passivamente. Quando gli anticorpi materni vengono perduti, la suscettibilità all'infezione aumenta e raggiunge un picco tra i 6 e i 12 mesi; successivamente questa si riduce progressivamente, mano a mano che gli anticorpi vengono acquisiti in seguito alla colonizzazione ad opera di batteri strettamente correlati ma non patogeni, come *N. lactamica*, o ceppi non virulenti di *N. meningitidis* o anche altri batteri che esprimono antigeni di superficie in comune con i ceppi virulenti di meningococco.

N. lactamica colonizza il nasofaringe più precocemente di *N. meningitidis* e i bambini portatori sviluppano anticorpi che attivano la lisi mediata dal complemento e l'opsonofagocitosi di un ampio spettro di meningococchi patogeni. Via via che i bambini crescono la colonizzazione da parte di *N. meningitidis* sostituisce quella da *N. lactamica*; che viene isolata raramente dal nasofaringe degli adolescenti. La colonizzazione da parte di *N. meningitidis* induce anticorpi contro il ceppo infettante e contro altri ceppi; in questo modo l'immunità naturale viene rinforzata e allargata. L'immunizzazione può derivare, inoltre, dalla produzione di anticorpi gruppo-specifici indotta dal contatto con polisaccaridi capsulari che presentano reazioni crociate e che derivano da altri batteri. Alcuni ceppi di *Bacillus pumilis* e di *Streptococcus* di gruppo D producono, infatti, polisaccaridi crociati con quelli di meningococchi di gruppo A. Inoltre, l'antigene capsulare K92 di *E. coli* presenta reazioni crociate con il polisaccaride meningococcico di gruppo C e l'antigene K1 di *E. coli* con il polisaccaride di gruppo B.

Nelle forme non fulminanti la terapia della malattia meningococcica non presenta difficoltà, ed il tasso di letalità non è superiore al 5%. La terapia deve iniziare il più presto possibile, anche prima dell'identificazione del meningococco. La penicillina G resta il farmaco di prima scelta (anche se in Europa è stata descritta una resistenza di grado lieve). Sebbene questo farmaco non oltrepassi la barriera ematoencefalica in condizioni normali, raggiunge rapidamente le meningi quando queste risultano affette da uno stato infiammatorio acuto. Il cloramfenicolo è efficace quanto la penicillina e deve essere utilizzato in casi con una chiara anamnesi di reazione anafilattica alla penicillina. Risultano, infine, efficaci anche le cefalosporine di terza generazione che vengono spesso impiegate all'inizio della terapia, quando l'eziologia della meningite è incerta (Welch e Nadel, 2003).

Nonostante la disponibilità di potenti antibiotici e nonostante i progressi nel trattamento nelle unità di cura intensiva, la mortalità complessiva per malattia meningococcica è pari a

circa il 10%; tale percentuale diminuisce fino al 5% nei pazienti con meningite meningococcica, ma può arrivare anche al 50-60% nei pazienti con meningococcemia fulminante e shock.

Esistono due metodi per attuare la prevenzione della malattia meningococcica: la chemioprophilassi e la immunoprofilassi. Per la chemioprophilassi attualmente vengono impiegate la rifampicina e la minociclina che possono eliminare temporaneamente lo stato di portatore e minimizzare i casi secondari di infezione. Per la immunoprofilassi vengono utilizzati vaccini costituiti da polisaccaridi capsulari purificati provenienti da ceppi patogeni di meningococchi di sierogruppo A, C, Y e W-135 che inducono risposte anticorpali battericide gruppo-specifiche dopo iniezione sottocutanea. Sia vaccini monovalenti che un vaccino tetravalente che contiene tutti questi antigeni sono disponibili per prevenire e controllare le epidemie. Attualmente, inoltre, sono in corso ricerche per l'allestimento di un vaccino efficace anche per il meningococco di sierogruppo B (Stephens e Zimmer, 2002).

Modelli animali per lo studio della meningite meningococcica

Essendo i meningococchi microrganismi a ristretto spettro d'ospite, è scarsa la disponibilità di modelli animali per lo studio del loro ciclo infettivo. Le informazioni che abbiamo al riguardo derivano pertanto, per lo più, da studi effettuati utilizzando sistemi di infezione *in vitro* (colture cellulari o colture d'organo).

Lo sviluppo di modelli animali di infezione è, tuttavia, prerequisito indispensabile per lo studio di aspetti importanti della patogenesi come il microambiente batterico, l'induzione di una risposta infiammatoria ed immunitaria, l'espressione genica batterica nell'ambiente dell'ospite, insieme alla capacità di saggiare mutanti per la loro virulenza o antigeni come candidati vaccini.

Per studiare la patogenesi della malattia meningococcica e per testare l'efficacia di vaccini, negli anni sono stati sviluppati numerosi modelli animali: l'infezione meningococcica sperimentale è stata indotta in scimmie (Flexner, 1907), topi (Huet e Suire, 1979), conigli (Branham *et al.*, 1937), embrioni di pollo (Buddingh *et al.*, 1939) e porcellini d'india (Branahame Lillie, 1932; Frasci e Robbins, 1978). Questi modelli hanno richiesto l'iniezione dei batteri sia direttamente nel fluido cerebrospinale che nel sangue o nello spazio sottocutaneo. È possibile, tuttavia, che l'instaurarsi della malattia in questi modelli animali fosse dovuta all'iniezione diretta dei prodotti batterici tossici.

Ad oggi, il modello più diffuso per lo studio delle infezioni batteriche, e in particolare per testare l'efficacia di vaccini, è il modello murino. Il modello murino differisce dal modello umano, ospite naturale del meningococco, in quanto un topo normale è capace di controllare ed eliminare alti livelli di batteriemia senza mostrare segni clinici di malattia e morte. Pertanto per molti anni lo sviluppo di vaccini antimeningococco è stato ostacolato dalla mancanza di un modello animale in grado di mimare la colonizzazione nasofaringea e la conseguente invasione nel torrente circolatorio.

Il basso potenziale di crescita dei meningococchi negli ospiti murini è dovuto principalmente al fatto che i recettori per la transferrina meningococcica sono specifici per la transferrina umana ed inoltre tali strutture non sono in grado di legare e di utilizzare la transferrina murina come sorgente di ferro. Pertanto l'aggiunta di ferro prima dell'infezione è risultata indispensabile per rendere più suscettibile l'ospite e fornire una sorgente disponibile di ferro per la crescita del meningococco, sotto forma di transferrina ferrica (Holbein, 1980).

Nell'ambito della valutazione di potenziali vaccini, sono stati analizzati diversi modelli animali. Un primo modello animale di meningite meningococcica è stato sviluppato nel topo neonato, nel quale l'inoculo per via intranasale dei meningococchi determina colonizzazione nasofaringea e, successivamente, in una percentuale di casi associata alla

virulenza dei ceppi, batteriemia. Questo modello si è rivelato utile per lo studio della patogenesi iniziale della malattia e del ruolo dell'immunità mucosale, tuttavia la morte associata a leptomeningite purulenta e ventricolite, sopraggiunge soltanto in una ridotta percentuale (circa il 4%) dei topi infettati. In questo modello animale, la batteriemia è generalmente preceduta da colonizzazione polmonare ed è stimolata dall'iniezione intraperitoneale di composti contenenti ferro. Questi fattori, unitamente alla bassa percentuale di induzione di meningite, costituiscono i limiti di questo modello animale sperimentale (Mackinnon *et al.*, 1992; Salit e Tomalty, 1984; Salit *et al.*, 1984).

Più recentemente, è stato sviluppato un modello sperimentale per l'instaurarsi di una infezione meningococcica sistemica e disseminata nel ratto neonato inoculato intraperitonealmente, che consente di superare l'ostacolo rappresentato dalle iniziali fasi di colonizzazione e di invasione mucosale uomo-specifiche, ma che non determina, o lo fa in una ridotta percentuale dei topi infettati, infiammazione meningeale e conseguente meningite purulenta (Saukkonen, 1988; Toropainen *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000). È di rilievo il fatto che, comunque, entrambi i sistemi sperimentali richiedano l'uso di animali neonati, il cui sistema immunitario è decisamente immaturo.

Del resto, *N. meningitidis* è un patogeno strettamente umano e non colonizza di solito il nasofaringe del topo. L'adesione iniziale alle cellule epiteliali è mediata dai pili, strutture di superficie filamentose, che riconoscono recettori di superficie delle cellule umane CD46. Recentemente, per mimare l'ospite umano, sono stati utilizzati topi transgenici CD46 che esprimono CD46 umano con specificità tissutale umana (topi "umanizzati"). Topi transgenici CD46 e topi C57BL/6 non transgenici sono stati infettati via intraperitoneale con ceppi di sierogruppo C e W-135. I tassi di mortalità dei topi transgenici CD46 risultano ceppo- e dose-dipendente, mentre i topi non transgenici sopravvivono dopo iniezione batterica. Dopo inoculo intraperitoneale, sia i topi transgenici CD46 che i topi non

transgenici hanno sviluppato batteriemia, ma solo nei topi transgenici si è sviluppata la malattia letale (Johansson *et al.*, 2003).

Questo sistema sperimentale, sebbene assai valido per lo studio della batteriemia, non permette, tuttavia, di riprodurre l'intera sequenza degli eventi infettivi che caratterizzano la malattia meningococcica, in particolare l'induzione di meningite.

La possibilità di causare meningite in un modello animale rappresenta, quindi, il traguardo finale che potrebbe risultare strategicamente indispensabile per approfondire aspetti patogenetici ed immunologici della meningite meningococcica.

Recentemente è stato sviluppato un modello di meningite pneumococcica basato sull'inoculazione dei batteri nel cervello di topi *outbred* attraverso il bregma, *intracerebral-bregma route* (Chiavolini *et al.*, 2004).

Il bregma è il punto di giunzione fra i lobi frontali e i lobi olfattivi e può essere individuato dal semplice esame visivo della calotta cranica. La tecnica messa a punto prevede che gli animali siano inoculati per via intracranica (i.c.) attraverso un punto molle della scatola cranica le cui coordinate stereotassiche sono: 0 mm (piano x, laterale), 3.5 mm (piano y, rostrale) e 2 mm (piano z, ventrale) dal bregma (Plaxinos e Franklin, 2001). È stato effettuato uno studio preliminare, iniettando per via intracranica 30µl *trypan blue*, ed effettuando, successivamente, sezioni coronali del cranio per seguire la diffusione del colorante dal punto di iniezione attraverso il cervello. Il colorante diffonde rapidamente dal punto di iniezione negli spazi subaracnoidei e ventricolari. Questo sito di inoculo è stato, pertanto, chiamato, intracranico/subaracnoideo (Fig. 6). Le analisi istologiche delle sezioni di cervello hanno confermato che l'ago attraversa i lobi frontali e raggiunge lo spazio subaracnoideo. Per verificare se la tecnica di iniezione sia traumatica per gli animali, sono stati effettuati altri esperimenti inoculando topi controllo con PBS 1X: gli animali si sono prontamente ripresi dopo l'iniezione e non hanno presentato alcun segno neurologico per diverse settimane.

Tali risultati hanno provato la fattibilità della tecnica di infezione intracranica/subaracnoidea. Attraverso questa tecnica di infezione è stato possibile riprodurre, in topi *outbred*, gli eventi patogenetici che caratterizzano la meningite pneumococcica (Chiavolini *et al.*, 2004).

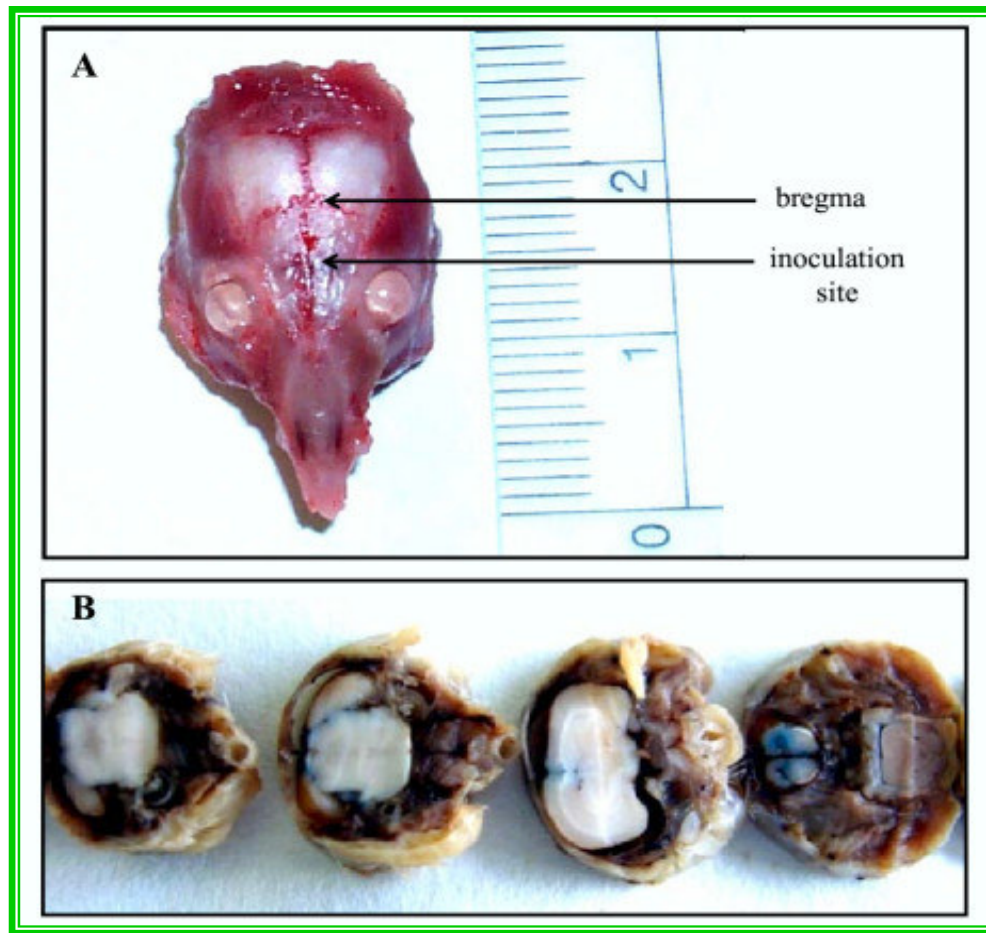


Figura 6. Sito d'iniezione intracranico/subaracnoideo in topi *outbred*

A. Esatta posizione del sito d'inoculo rispetto al bregma, indicato con la freccia. **B.** Sezioni coronali del cervello; è visibile la diffusione del *trypan blue* dal sito d'inoculo agli spazi subaracnoidei e ventricolari (Chiavolini *et al.*, 2004).

Ottimizzando questo sistema sperimentale, nel presente lavoro, abbiamo, pertanto, inteso sviluppare un modello di meningite meningococcica in *outbred mice* ed, inoltre, un sistema di analisi dell'espressione genica nell'ospite animale, volti all'identificazione e allo studio

di eventi genetici e molecolari responsabili dell'acquisizione di caratteri di patogenicità in *N. meningitidis*.

Geni metabolici implicati nella patogenicità di *N. meningitidis*

Nonostante *N. meningitidis* sia responsabile di una considerevole morbilità e mortalità nei Paesi sviluppati e, soprattutto, nei Paesi in via di sviluppo, gli studi condotti al fine di comprendere la fisiologia e la biochimica di questo batterio non sono numerosi e la maggior parte di essi risale ad una trentina d'anni fa. Poche sono, quindi, le conoscenze circa le probabili interazioni tra i processi metabolici ed i meccanismi patogenetici che possono determinare l'innescare ed il perdurare dell'infezione meningococcica, in cui un fattore di cruciale rilevanza è indubbiamente la capacità del batterio di captare e sintetizzare nutrienti essenziali per la sua sopravvivenza nei differenti microambienti (intracellulari ed extracellulari) in cui si viene a trovare nell'ospite nel corso del processo infettivo.

Recentemente sono stati identificati ben 73 geni che risultano essenziali per l'infezione sistemica nel modello di infezione del ratto neonato, dei quali circa la metà codifica per enzimi coinvolti nel metabolismo e nel trasporto di nutrienti (Sun *et al.*, 2000). Tali geni sono stati identificati mediante la tecnica STM (*signature-tagged mutagenesis*), applicata con successo anche ad altri patogeni, tra cui *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Hensel *et al.*, 1995; Mei *et al.*, 1997; Chiang e Mekalanos, 1998; Polissi *et al.*, 1998; Camacho *et al.*, 1999). Tale tecnica consente di *screenare*, simultaneamente, *in vivo*, un ampio numero di mutanti, allo scopo di individuare geni essenziali per l'instaurarsi ed il perdurare dei processi infettivi. Questa è una caratteristica tipica della tecnica STM, che non si ritrova in altre strategie di genomica funzionale sviluppate per lo studio dei patogeni *in vivo*. Le

tecniche IVET (*in vivo expression technology*) e DFT (*differential fluorescent technology*), ad esempio, consentono di identificare geni la cui espressione è indotta nell'ospite, ed esperimenti addizionali sono poi richiesti per stabilire se questi geni sono necessari durante la fase di colonizzazione dei tessuti (Mecsas, 2002).

Un dato interessante che è emerso da questo studio è che circa la metà dei geni coinvolti nella patogenesi meningococcica codifica enzimi implicati nel metabolismo.

In particolare, sono stati identificati geni codificanti proteine trasportatrici di nutrienti, tra cui la L-lattato permeasi e proteine trasportatrici del fosforo (*ptsH*), geni implicati nella biosintesi di purine, pirimidine, nucleosidi e nucleotidi (*galU*, *purL*), nella biosintesi di cofattori (*pabB*), nel metabolismo degli acidi grassi e dei fosfolipidi (*dgkA*), nel metabolismo dei carboidrati (*fda*, *grxC*). Undici di questi geni, in particolare, sono coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi: cinque (*aroB*, *aroC*, *aroD*, *aroE*, *aroG*) nella via dello scimato, due (*ilvD* e *ilvL*) nella sintesi dell'isoleucina e della valina, due (*metF* e *metH*) nella biosintesi della metionina, uno (*fhs*) nella sintesi del 10-formil-tetraidrofosfato, utilizzato nella sintesi delle purine e nella formazione del tRNA con metionina, uno (*gdhA*) nel metabolismo del glutammato.

Sebbene lo studio del metabolismo del meningococco sia cominciato più di 40 anni fa e l'analisi genomica sia diventata strumento indispensabile per il suo studio (Tettelin *et al.*, 2000), le nostre conoscenze circa i *pathways* metabolici e i sistemi di trasporto di questo microorganismo sono ben lontane dall'essere esaurienti. Inoltre, solo pochi *pathways* metabolici sono stati studiati in riferimento all'interazione con la cellula ospite (Deghmane *et al.*, 2002; 2004; Delany *et al.*, 2004; Grifantini *et al.*, 2003).

Metabolismo del carbonio in *N. meningitidis*

Il meningococco è in grado di crescere solo su un ristretto *range* di sorgenti di carbonio ossia glucosio, maltosio, lattato e piruvato (Leighton *et al.*, 2001). Il genoma di *N. meningitidis* codifica tutti gli enzimi della glicolisi ad eccezione della fosfofruttochinasi, che catalizza la conversione del fruttosio 6-fosfato a fruttosio 1,6-difosfato. A causa della mancanza di questo enzima chiave, il glucosio non può percorrere la via glicolitica nella sua interezza: esso, infatti, viene metabolizzato fondamentalmente attraverso la via di Entner-Doudoroff ed in parte anche attraverso la via dei pentosi fosfati, i cui *set* completi di enzimi sono stati ritrovati nel genoma di *N. meningitidis* (Holten e Jyssum, 1973; Holten, 1974; Parkhill *et al.*, 2000) (Fig.7).

La via dei pentosi fosfati, in particolare, è presente in tutte le cellule, eucariotiche e procariotiche, e rappresenta un percorso alternativo di degradazione del glucosio che porta alla formazione di prodotti fondamentali per il metabolismo cellulare, come il ribosio 5-fosfato, necessario per la biosintesi dei nucleotidi, l'eritrosio 4-fosfato, richiesto nella biosintesi degli aminoacidi aromatici, ed è inoltre una importante fonte di potere riducente, sotto forma di NADPH.

Entrambi i percorsi (via di Entner-Doudoroff e via dei pentosi fosfati) convertono il glucosio a gliceraldeide 3-fosfato e da qui la conversione a piruvato avviene così come nella glicolisi.

Il maltosio viene idrolizzato dall'enzima maltasi con formazione di due molecole di glucosio, mentre il lattato viene convertito ad acido piruvico mediante l'enzima lattico deidrogenasi FAD-dipendente.

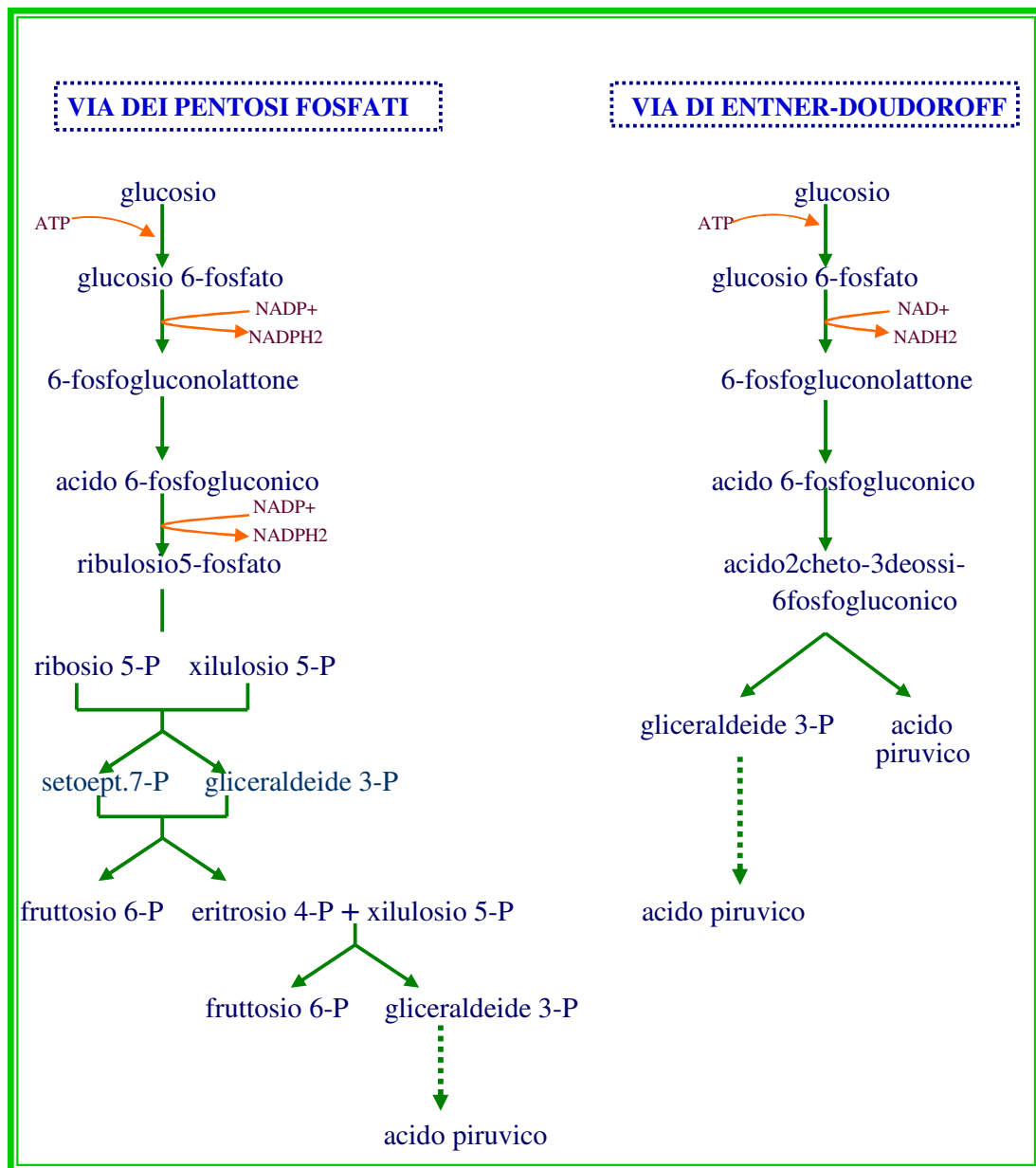
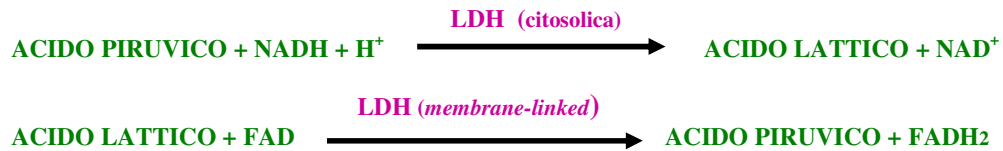


Figura 7. Via dei pentosi fosfati e via di Entner-Doudoroff

La figura illustra schematicamente le tappe della degradazione del glucosio attraverso la via dei pentosi fosfati e la via di Entner-Doudoroff, i due principali percorsi del catabolismo dei carboidrati in *N. meningitidis*.

La capacità di crescere su lattato richiede la presenza dell'enzima Lattico deidrogenasi (LDH) che catalizza l'ossidazione del lattato a piruvato. *N. meningitidis* possiede una LDH NADH-dipendente citoplasmatica, implicata fundamentalmente nella riduzione del

piruvato a lattato, e due LDH FAD-dipendenti associate alla membrana, e specifiche una per l'isomero L e l'altra per l'isomero D del lattato, che catalizzano l'ossidazione del lattato a piruvato come illustrato qui di seguito (Erwin e Gotschlich, 1993; 1996).



Gli isomeri del lattato non sono entrambi prodotti dall'uomo: cellule di mammifero, infatti, producono solo l'isomero L, il quale può comunque essere utilizzato dal meningococco nel torrente circolatorio, nel liquido cerebro-spinale e nel nasofaringe (Erwin e Gotschlich, 1996). Tuttavia l'isomero D del lattato può essere prodotto a partire dal glucosio, da alcuni batteri lattici presenti al livello del nasofaringe, iniziale sito di colonizzazione del meningococco.

Le LDH associate alla membrana trasferiscono gli elettroni direttamente dal lattato, attraverso il FAD, alla catena di trasporto degli elettroni a livello del *pool* del chinone. Recentemente è stata dimostrata la presenza in *N. meningitidis* di una seconda L-LDH FAD-dipendente, associata alla membrana, con una probabile differente regolazione rispetto alla prima. In particolare, è stato osservato che l'L-LDH-1 presenta un'attività più alta in batteri cresciuti su piastra, un'attività intermedia in batteri cresciuti in terreno liquido ben aerato, e più bassa in batteri cresciuti in terreno liquido poco aerato. Invece l'L-LDH-2 mostra un'attività più alta in batteri cresciuti in mezzo poco aerato. L'attività di questi enzimi potrebbe, quindi, essere differentemente regolata dalla tensione di ossigeno, ma il meccanismo di regolazione non è ancora chiaro (Erwin e Gotschlich, 1996).

L'acido piruvico, a sua volta, mediante il sistema della piruvato deidrogenasi, passa ad acetilCoA, il quale è catabolizzato attraverso la via degli acidi tricarbossilici (TCA).

L'analisi della sequenza genomica completa del ceppo MC58 di *N. meningitidis*, sierogruppo B, ha confermato la presenza di tutti gli enzimi del ciclo TCA, ad esclusione della malato deidrogenasi NAD-dipendente, sostituita da una malato ossidasi FAD-dipendente legata alla membrana (Holten, 1976; Parkhill *et al.*, 2000). La malato ossidasi FAD-dipendente è associata alla catena di trasporto degli elettroni, ed ha il compito di trasferire questi ultimi dal malato al FAD, dal quale vengono direttamente incanalati nella catena respiratoria.

Mediante studi di NMR (risonanza magnetica nucleare) si è osservato che glucosio, piruvato e lattato, oltre ad essere metabolizzati attraverso la via degli acidi tricarbossilici, sono metabolizzati anche attraverso la via Pta-Ack (fosfotransacetilasi-acetatochinasi) che porta alla produzione di acetato a partire da AcetilCoA. Studi condotti su estratti proteici hanno confermato la presenza in *N. meningitidis* di elevate attività di Pta e di Ack, soprattutto in presenza di glucosio come sorgente di carbonio (Leighton *et al.*, 2001).

Nel *pathway* Pta-Ack il composto di partenza è l'acetilCoA, intermedio metabolico centrale, il quale viene convertito prima ad acetilfosfato, per mezzo della Pta, poi ad acetato, mediante l'Ack (Fig. 8).

La principale conseguenza di tale percorso metabolico è la riduzione della quantità di energia ottenuta da una singola sorgente di carbonio (glucosio, lattato, piruvato): questo ultimo, infatti, è deviato verso la produzione di acetato e non viene ossidato attraverso il ciclo TCA, sicuramente più proficuo dal punto di vista energetico.

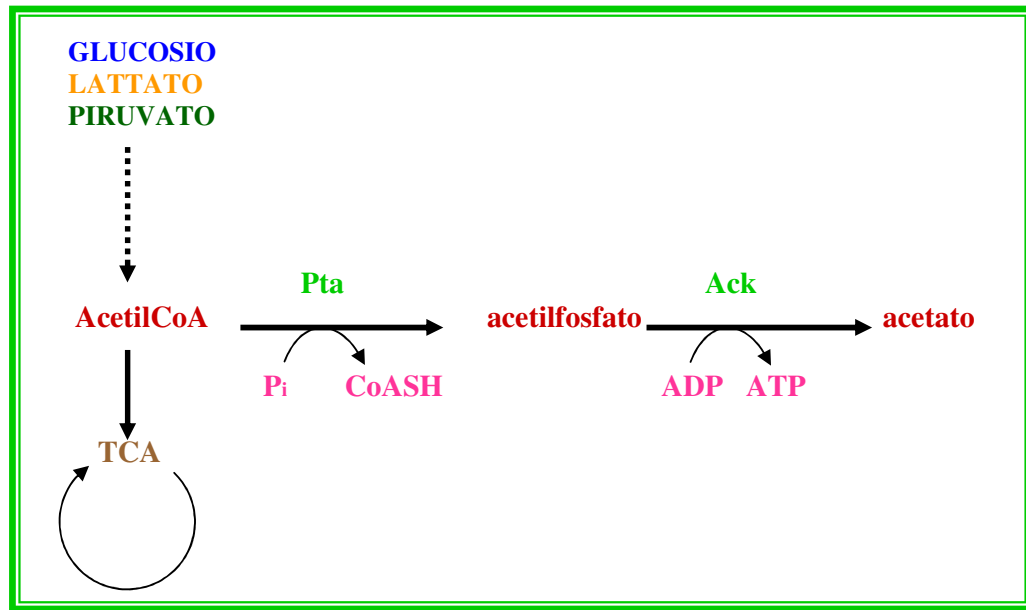


Fig. 8. Rappresentazione schematica del *pathway* Pta-Ack

Glucosio, piruvato e lattato, oltre ad essere metabolizzati attraverso la via degli acidi tricarbossilici, sono metabolizzati anche attraverso la via Pta-Ack che porta alla produzione di acetato a partire da acetilCoA.

Gli enzimi Pta e Ack si possono ritrovare in alcune vie fermentative che portano alla formazione di acetato e, comunque, la produzione di acetato mediante il *pathway* Pta-Ack si ritrova comunemente in numerosi batteri cresciuti in un mezzo in cui la sorgente di carbonio è in eccesso. In tali condizioni, infatti, l'incapacità del ciclo degli acidi tricarbossilici di metabolizzare tutto il carbonio che entra nella cellula fa sì che l'acetilCoA intraprenda il *pathway* Pta-Ack con produzione di ATP, CoASH ed acetato (Elmansi e Hoims, 1989). Si può, quindi, affermare che il livello di acetilfosfato nel mezzo riflette lo stato nutrizionale della cellula: una sua elevata concentrazione corrisponde ad un eccesso di carbonio e viceversa (Wolfe *et al.*, 2003).

Nonostante non sia ancora stato chiarito il significato fisiologico di questo percorso metabolico in *N. meningitidis*, la crescita sulle differenti sorgenti di carbonio, localizzate nei diversi siti all'interno dell'ospite, potrebbe influenzare le attività di Pta e Ack ed alterare il *pool* intracellulare di acetilfosfato. Questa alterazione potrebbe forse essere usata

come segnale globale da parte del batterio durante il processo patogeno, così come è stato dimostrato in *Vibrio cholerae* ed in *Streptococcus pneumoniae* in cui mutazioni nei geni che codificano la Pta e la piruvato ossidasi (enzima che converte il piruvato ad acetilfosfato in *Streptococcus pneumoniae*) ne alterano la virulenza (Chiang e Mekalanos, 1998; Spellerberg *et al.*, 1996).

Influenza del lattato sul metabolismo e sulla patogenicità di

N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae

N. gonorrhoeae, come *N. meningitidis*, cresce efficientemente solo su glucosio, piruvato o lattato (Morse e Hebel, 1978). Anche in *N. gonorrhoeae* sono state identificate tre isoforme di lattico deidrogenasi FAD-dipendenti, associate alla membrana citoplasmatica e correlate al trasporto degli elettroni. In particolare, l'isoenzima LDH-1 utilizza esclusivamente il lattato come substrato, con una preferenza per l'isomero D; l'isoenzima LDH-2, invece, presenta una più ampia specificità di substrato (lattato, fenil lattato, 4 idrossifenil lattato) ma è stereospecifico per l'isomero L. Anche nel gonococco, come nel meningococco, è stata identificata una terza L-LDH FAD-dipendente associata alla membrana; infine è presente una LDH citoplasmatica, NAD-dipendente (Fischer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2001).

Studi condotti su cellule di *N. gonorrhoeae* cresciute in un mezzo contenente glucosio, hanno dimostrato che l'aggiunta di lattato, secondo le concentrazioni presenti *in vivo*, stimola la crescita, la sintesi di proteine e di LPS (Smith *et al.*, 2001). Inoltre la stimolazione del metabolismo a partire dal lattato converge nella produzione di acetilCoA e ATP, attraverso la riduzione del NAD^+ e non verso la gluconeogenesi che è rifornita dal lattato solo in caso di assenza di glucosio. La presenza di una rapida sorgente di NADH, di acetilCoA e, conseguentemente, di ATP è la probabile spiegazione della stimolazione del

metabolismo del gonococco e dell'*uptake* dell'ossigeno, quando il lattato è aggiunto al mezzo contenente glucosio. Questa ipotesi è supportata dal fatto che anche il piruvato incrementa il tasso di crescita in presenza di glucosio (Smith *et al.*, 2001).

Del resto, lattato e glucosio sono entrambi presenti in numerosi siti in cui si verifica l'infezione *in vivo*, quali le secrezioni genitali, gli essudati infiammatori ed il sangue per il gonococco, e l'epitelio mucosale nasofaringeo per il meningococco. Queste considerazioni permettono, quindi, di ipotizzare un possibile coinvolgimento del lattato nei processi patogenetici. Il generale incremento del metabolismo promosso dal lattato potrebbe, infatti, determinare un incremento nella sintesi dei determinanti di virulenza, come i pili di tipo IV, che determinano l'adesione del batterio alla cellula ospite e le proteine Opa che promuovono l'ingresso del batterio nelle cellule epiteliali.

Evidenze specifiche si hanno sulla stimolazione da parte del lattato della sintesi del lipopolisaccaride (LPS) (Gao *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2001).

In realtà, questa considerazione può essere estesa anche ad altri batteri patogeni poiché, *in vivo*, lattato e glucosio sono presenti entrambi in numerosi siti infettati: si può, quindi, ipotizzare la presenza di un meccanismo comune, mediante il quale il lattato, in presenza di glucosio, influenzi la patogenicità di svariati microrganismi (Smith *et al.*, 2001).

Studi iniziali suggeriscono, infatti, che il metabolismo del lattato sia implicato nella capacità di sopravvivere nel circolo ematico di *Haemophilus influenzae* (Kuratana e Anderson, 1991). Più recentemente, inoltre, studi di mutagenesi hanno permesso di isolare in *Neisseria meningitidis* un mutante lattato permeasi-difettivo; tale mutante presenta una virulenza considerevolmente attenuata nel modello d'infezione del ratto neonato (Sun *et al.*, 2000).

Inoltre, mutanti difettivi per l'*uptake* del lattato sono stati utilizzati per comprendere il contributo di questa fonte di carbonio e di energia durante la fase di colonizzazione. Campioni di tessuto nasofaringeo sono stati inoculati con mutanti di meningococco lattato

permeasi-difettivi e con ceppi selvatici. Dopo 18 ore dall'inoculo i mutanti lattato permeasi-difettivi sono isolati a livelli significativamente più bassi rispetto ai meningococchi *wild-type*. Tale risultato non è dovuto a cambiamenti nell'espressione delle adesine o ad alterazioni dell'iniziale processo pilus-mediato di adesione alle cellule epiteliali; sembra, invece, che il lattato risulti un importante fonte di energia per il batterio durante la colonizzazione e sia necessario per la crescita nel tessuto nasofaringeo (Exley *et al.*, 2005).

Per sopravvivere nel circolo sistemico *N. meningitidis* deve sfuggire ai meccanismi d'immunità innata dell'ospite, in particolare al sistema del complemento, processo maggiormente coinvolto nella protezione dall'infezione meningococcica. Ciò che conferisce resistenza al batterio nei confronti del complemento è la sialilazione dell'LPS. In *N. meningitidis*, l'LPS è sintetizzato a partire da N-acetilmannosamina e fosfoenolpiruvato mediante l'enzima SiaC. Il fosfoenolpiruvato può essere sintetizzato a partire dal glucosio attraverso la via di Entner-Doudoroff, oppure può essere ottenuto direttamente dal lattato dopo conversione a piruvato, suggerendo così un potenziale legame tra la disponibilità di lattato e la resistenza alla lisi complemento mediata. A riprova del possibile legame, la sensibilità al complemento in mutanti lattato permeasi difettivi è stata osservata anche in mutanti di meningococco acapsulati (Exley *et al.*, 2005).

Il lattato potrebbe, pertanto, essere utilizzato per la crescita meningococcica e per promuovere la resistenza alla lisi complemento mediata, favorendo così la sopravvivenza del batterio nel sangue e aumentando probabilmente le possibilità che l'infezione possa evolvere in malattia.

Il metabolismo del glutammato in *N. meningitidis*

Il glutammato svolge due importanti ruoli nel metabolismo cellulare: è la sorgente dell'85% dell'azoto presente nelle molecole organiche (α -amminogruppi per la sintesi di purine, pirimidine ed amminoacidi) e gioca un ruolo di primaria importanza nell'osmoprotezione.

L'enzima chiave del metabolismo del glutammato è la glutammato deidrogenasi (GDH), enzima ubiquitario che rappresenta un punto di congiunzione tra il metabolismo del carbonio ed il metabolismo dell'azoto (Smith, 1975).

La funzione fisiologica di tale enzima può essere anabolica e/o catabolica, e ciò è generalmente stabilito dalla natura del cofattore associato, NAD^+ (NAD-GDH) o NADP^+ (NADP-GDH). Di solito gli enzimi NADP-GDH catalizzano l'assimilazione diretta dell'ammonio mediante aminazione riduttiva del 2-oxoglutarato per formare L-glutammato (percorso anabolico), secondo la reazione:



Gli enzimi NAD-GDH, invece, catalizzano prevalentemente la reazione inversa ossia la deaminazione ossidativa del glutammato a 2-oxoglutarato ed ammonio (percorso catabolico), secondo la reazione:



Nei mammiferi l'enzima GDH è localizzato a livello della matrice mitocondriale dove svolge un ruolo fondamentale per il metabolismo dei gruppi amminici dei venti L-amminoacidi comunemente presenti nelle proteine.

Tra i procarioti, vi sono microrganismi che posseggono sia la NAD-GDH che la NADP-GDH; il primo enzima è coinvolto nel catabolismo del glutammato, mentre il secondo sia nell'assimilazione dell'ammonio che nella sintesi del glutammato (Merrick e Edwards, 1995).

Vi sono, tuttavia, anche molte specie batteriche che posseggono una sola isoforma della glutammato deidrogenasi come *Escherichia coli* (McPherson e Wotton, 1983), *Salmonella typhimurium* (Miller e Brenchley, 1984), *Klebsiella aerogenes* (Mountain *et al.*, 1985), *Corynebacterium glutamicum* (Bormann *et al.*, 1992), nei quali è presente solo la NADP-GDH, codificata dal gene *gdhA* e coinvolta nell'assimilazione dell'ammonio piuttosto che nel catabolismo del glutammato.

In molti microrganismi, nei lieviti e nelle piante superiori è presente un percorso alternativo di assimilazione dell'ammonio, chiamato ciclo GS/GOGAT, in cui si assiste all'azione combinata di due enzimi: la glutammina sintetasi (GS) e la glutammato sintetasi (GOGAT). In questo ciclo, la glutammina sintetasi catalizza l'aminazione (ATP-dipendente) del glutammato endogeno, con formazione di glutammina, secondo la reazione:



La glutammato sintetasi, invece, è coinvolta nel trasferimento del gruppo aminico dalla glutammina al 2-oxoglutarato, con formazione di glutammato, secondo la reazione.



Si tratta, quindi, di un sistema accoppiato che richiede ATP e potere riducente, ma ha una resa più elevata rispetto al sistema di GDH, in quanto il secondo enzima è stimolato dal prodotto del primo.

L'attività del ciclo GS/GOGAT, è strettamente dipendente dalla disponibilità di ammonio nel mezzo di crescita: in particolare, è elevata in condizioni di scarse quantità di azoto, mentre diminuisce in presenza di elevate concentrazioni dello stesso. Al contrario, la biosintesi di L-glutammato da parte della NADP-GDH risulta efficiente solo ad elevate concentrazioni di ammonio, a causa della bassa affinità dell'enzima per quest'ultimo (Reitzer e Schneider, 2001; Helling, 1994).

I circuiti regolatori coinvolti nelle vie di assimilazione dell'ammonio sono stati studiati in maniera molto approfondita nelle *Enterobacteriaceae*: il gene *gdhA* è sotto il controllo di diversi circuiti di regolazione, tra questi quello maggiormente caratterizzato è il peptide regolatore Nac (la proteina di controllo dell'assimilazione dell'azoto). Nac reprime la trascrizione del gene *gdhA* in cellule di *Klebsiella* e di *E. coli* fatte crescere in mezzi di coltura poveri di ammonio. A sua volta il peptide Nac è sotto il controllo globale del sistema di regolazione dell'azoto Ntr. Questo sistema si basa sull'esistenza di due componenti, ed utilizza una RNA polimerasi trasportata dal comune fattore σ^{54} .

La presenza nel genoma di *N. meningitidis* di un gene codificante la NADP-GDH ed un gene codificante la NAD-GDH è stata solo di recente identificata, grazie al sequenziamento dell'intero genoma di ceppi di meningococco di sierogruppo A e B (Parkill *et al.*, 2000; Tettelin *et al.*, 2000). È stato anche identificato il gene codificante la glutammina sintetasi (GS), ma è assente il gene per la glutammato sintetasi (GOGAT); i meningococchi non sono, pertanto, in grado di effettuare il ciclo GS/GOGAT, suggerendo un maggior ruolo per l'NADP-GDH nell'assimilazione dell'azoto. Inoltre, l'assenza di un fattore σ^{54} funzionale, implica la presenza di meccanismi di regolazione alternativi a quelli ben caratterizzati nelle *Enterobacteriaceae* (Laskos *et al.*, 1998).

È interessante sottolineare che *gdhA* costituisce uno dei circa trenta geni necessari per la virulenza nel modello di infezione sperimentale murino (Sun *et al.*, 2000).

Recentemente, inoltre, in uno studio volto ad identificare i geni associati alla virulenza del meningococco, è stato dimostrato che il gene *gdhA* presenta un'espressione differenziale in ceppi patogeni, isolati da malati, e in ceppi commensali, isolati da portatori sani; in particolare è stata evidenziata una sovra-espressione di *gdhA* in ceppi ipervirulenti appartenenti alla linea ET-5, sierogruppo B, e alla linea IV-1, sierogruppo A (Pagliarulo *et al.*, 2004).

Le analisi effettuate hanno dimostrato che l'espressione differenziale del gene *gdhA* non dipende da mutazioni del gene, poichè la sua sequenza è altamente conservata in tutti i ceppi analizzati, non dipende da alterazioni del promotore o del terminatore, essendo anche questi fortemente conservati, ed infine non dipende dalla diversa organizzazione della regione intercistronica *gdhA-gdhR* analizzata nei ceppi con diversa espressione dell'mRNA specifico di *gdhA*. Lo studio dei meccanismi molecolari responsabili dell'espressione del gene *gdhA* in isolati clinici di *N. meningitidis* con differente attività NADP-GDH ha portato ad individuare il ruolo di regolatore trascrizionale del gene *gdhR* sull'espressione differenziale del gene *gdhA* ed il suo probabile coinvolgimento nella patogenesi dell'infezione meningococcica.

Utilizzando le sequenze nucleotidiche disponibili in banca dati del genoma dei ceppi di *N. meningitidis* MC58 sierogruppo B (ET-5), Z2491 sierogruppo A (IV-I) e FAM18 sierogruppo C (ET-37) è stata costruita la mappa fisica e genetica della regione in cui mappa *gdhA*. Gli allineamenti delle sequenze hanno consentito di dimostrare che *gdhA* è altamente conservato tra i ceppi ed hanno, altresì, permesso di individuare, immediatamente a valle di *gdhA*, un gene, indicato come *gdhR*, che codifica un regolatore trascrizionale appartenente alla subfamiglia FadR della famiglia GntR dei regolatori batterici *helix-turn-helix* (Rigali *et al.*, 2002), trascritto in direzione opposta rispetto a *gdhA*.

Esperimenti di *primer extension* hanno evidenziato che nei ceppi di *N. meningitidis* appartenenti alle linee iper-virulente ET-5, di sierogruppo B, e IV-1, di sierogruppo A, che presentano alti livelli di mRNA per *gdhA*, il gene *gdhA* è trascritto a partire da due promotori *gdhA P1* e *gdhA P2*; al contrario nei ceppi esprimenti bassi livelli di mRNA per *gdhA* il promotore *gdhA P2* è inattivo, per effetto dei bassi livelli di espressione di *gdhR*.

Esperimenti di inattivazione inserzionale del gene *gdhR*, in un ceppo esprimente elevati livelli di mRNA per *gdhA*, hanno dimostrato che la proteina GdhR regola positivamente l'attività del promotore *gdhA P2*. La transattivazione di *gdhA P2* da parte di *gdhR* è massima in un terreno complesso GC (*GonoCoccal Agar*), durante la fase tardiva della crescita logaritmica, mentre, in un terreno a composizione chimica definita, MCDA (*Meningococcal Defined Agar*), è massima quando il glucosio è utilizzato invece del lattato come fonte di carbonio in presenza di glutammato come fonte di azoto. Nei ceppi nei quali il gene *gdhR* è stato inattivato si perde la regolazione di *gdhA* dipendente dalla fase di crescita e dalla fonte di carbonio.

Analisi di interazione DNA-proteina hanno, inoltre, consentito di dimostrare che il 2-oxoglutarato, un prodotto della reazione catabolica della GDH ed un intermedio del ciclo degli acidi tricarbossilici, inibisce il legame del regolatore GdhR al promotore *gdhA P2*. I livelli di 2-oxoglutarato, effettore negativo di GdhR, variano in funzione della fonte di carbonio disponibile: sono più alti in presenza di lattato, determinando una bassa espressione di *gdhA*, piuttosto che in presenza di glucosio, determinando un'elevata espressione di *gdhA*.

Questi dati rafforzano l'ipotesi che nei meningococchi la funzione principale dell'enzima GDH sia quella di supportare l'attività del ciclo degli acidi tricarbossilici rifornendolo di 2-oxoglutarato, quando il glutammato è disponibile nell'ambiente. Tale attività enzimatica promuove la stimolazione del metabolismo intermedio, in particolare quando il glucosio

prevale sul lattato come fonte di carbonio, come in alcuni siti dell'ospite rilevanti per il ciclo infettivo di *N. meningitidis*.

Il ruolo del 2-oxoglutarato come effettore della proteina GdhR, giustifica la regolazione trascrizionale del gene *gdhA* da parte della fonte di carbonio e di energia in un terreno chimicamente definito. Esistono, infatti, numerose evidenze che le sorgenti di carbonio influenzino l'attività del ciclo del TCA e del pool intracellulare di 2-oxoglutarato nelle *Neisserie* patogene. Infatti, questi microrganismi sono in grado di utilizzare pochi composti come fonte di energia quali il lattato, il piruvato, il glucosio e il maltosio. La variazione nel pool intracellulare del 2-oxoglutarato può essere responsabile dell'induzione di *gdhA* durante la fase logaritmica tardiva nei meningococchi cresciuti in un mezzo complesso GC. Il ruolo della NADP-GDH ed i meccanismi regolatori in questione possono avere ampie implicazioni poiché il glucosio, il lattato ed il glutammato sono presenti in svariati rapporti nei microambienti rilevanti per l'infezione meningococcica. Per esempio, il glucosio è la predominante sorgente di carbonio nel sangue (rapporto molare glucosio/lattato, 3 a 1), come pure nel liquido cerebrospinale (rapporto molare glucosio/lattato, circa 2.4 a 1 in soggetti sani). Diversamente, il lattato è la maggiore sorgente di carbonio nella saliva (rapporto glucosio/lattato circa 1 a 10 in soggetti sani), e negli ambienti mucosali colonizzati da batteri lattici come il nasofaringe. Dati precisi sulle concentrazioni del glucosio e del lattato nell'ambiente intracellulare dell'ospite sono difficili da ottenere *in vivo*. Le evidenze disponibili suggeriscono che il lattato ed il piruvato tendano ad essere usati come principali sorgenti di carbonio all'interno delle cellule fagocitiche. La potenzialità di numerosi ceppi di esprimere elevati livelli di NADP-GDH potrebbe, quindi, risultare in un vantaggio di crescita nei siti dell'ospite dove il glucosio prevale sul lattato o sul piruvato, ed il glutammato è presente come sorgente di azoto e carbonio, come nel sangue e nel fluido cerebrospinale. Questa deduzione potrebbe spiegare la presenza di elevati livelli di espressione di *gdhA* nelle linee iper-virulente, quali ET-5 e IV-I, e

l'incapacità dei mutanti di *gdhA* di stabilire un'infezione sistemica in ratti neonati inoculati intra-peritonealmente (Sun *et al.*, 2000), fornendo un nuovo legame tra il metabolismo dei meningococchi e la patogenesi dell'infezione.

I trasportatori del glutammato

Sia le cellule eucariotiche che quelle procariotiche presentano un gran numero di proteine integrali di membrana e complessi proteici coinvolti nel trasporto di soluti attraverso la membrana. È di rilievo il fatto che in *E. coli* circa il 10.8% di tutti i geni cromosomali codificano proteine di membrana coinvolte nel trasporto (Paulsen *et al.*, 1998). Recentemente tutte le proteine di trasporto, sia note che putative, sono state classificate in differenti famiglie in base ad omologia di sequenza. Questo sistema di classificazione ha permesso l'identificazione di 159 famiglie di trasportatori, all'interno delle quali i trasportatori secondari, comprendendo 59 famiglie, rappresentano la categoria funzionale più ampia (Saier, 1998).

La struttura tridimensionale dei trasportatori secondari non è ancora del tutto chiara; al momento, i modelli strutturali disponibili si basano su dati biochimici e analisi computazionali delle loro sequenze aminoacidiche. La struttura di un trasportatore secondario è in genere costituita da una singola catena polipeptidica che forma un fascio di α -eliche transmembrana connesse da *loops* di varia lunghezza. La maggior parte delle proteine presenta 12 segmenti transmembrana, ma il numero dei tratti transmembrana può spesso variare (Saier, 1998). Le 59 famiglie di trasportatori secondari non presentano altrettante strutture globali differenti. È stato infatti dimostrato, attraverso il profilo di idropatia delle sequenze aminoacidiche, che molte delle famiglie appartengono alla stessa classe strutturale (Lolkema e Slotboom, 1998).

Una delle famiglie che forma una classe strutturale distinta è la famiglia dei trasportatori del glutammato, denominata anche simporto dicarbossile/catione (DCS) (Saier, 1998).

La famiglia dei trasportatori del glutammato comprende proteine espresse nei neuroni e nelle cellule gliali del sistema nervoso dei mammiferi, coinvolte nel recupero del glutammato, neurotrasmettitore eccitatorio, dalla fessura sinaptica (Kanai, 1997). Dal momento che quantità eccessive di glutammato extracellulare, associate con alcune patologie, causano distruzione neuronale, tramite l'attivazione dei recettori dell'N-metil-D-aspartato, i trasportatori del glutammato neuronali e gliali giocano un ruolo importante nel prevenire l'eccitotossicità di questo neurotrasmettitore (Meldrum e Garthwaite, 1990). Essendo queste proteine coinvolte nella patogenesi di numerosi disordini neurologici, esse sono state, negli anni recenti, oggetto di numerosi ed approfonditi studi che hanno incuriosito diversi gruppi di ricerca. Pertanto sono stati rapidamente caratterizzati molti membri della famiglia dei trasportatori per il glutammato come i trasportatori per il glutammato retinale dei vertebrati (Arriza *et al.*, 1997; Eliasof *et al.*, 1998), i trasportatori per gli aminoacidi neutri dei mammiferi (Arriza *et al.*, 1993; Shafqat *et al.*, 1993) e proteine batteriche per l'*uptake* di nutrienti (Engelke *et al.*, 1989; Tolner *et al.*, 1992).

I membri della famiglia dei trasportatori del glutammato che sono stati caratterizzati funzionalmente, sono stati classificati in tre gruppi in base alla specificità di substrato: trasportatore C₄-dicarbossilato (batterico); trasportatore per il glutammato/aspartato (batterico ed eucariotico); trasportatore per gli aminoacidi neutri (batterico ed eucariotico). I trasportatori batterici C₄-dicarbossilati trasportano gli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici come succinato, fumarato e malato (Finan *et al.*, 1988; 1981). Tutti i trasportatori per il glutammato utilizzano l'L-glutammato e L-aspartato come substrati ad alta affinità (K_m [Glu] < 100 μ M).

Le proteine batteriche catalizzano il trasporto elettrogenico del glutammato mediante il simporto di almeno due cationi (Tolner *et al.*, 1992; 1995). Le proteine GltP di *E. coli* e

Bacillus subtilis utilizzano protoni per guidare l'*uptake* del glutammato, mentre le proteine GltT di *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus caldotenax* possono sostituire un protone con uno ione Na^+ (Heyne *et al.*, 1991). Il sodio è preferenzialmente utilizzato ad elevate temperature dai suddetti microrganismi, ma la selettività per gli ioni Na^+ è persa quando questi trasportatori sono espressi in *E. coli* (Tolner *et al.*, 1995). Queste osservazioni indicano che piccoli cambi conformazionali potrebbero alterare la specificità per i cationi.

Al contrario il trasporto del glutammato ad opera delle proteine eucariotiche risulta strettamente dipendente dalla presenza di ioni sodio. Infatti, i trasportatori per il glutammato eucariotici catalizzano il trasporto elettrogenico del glutammato, all'interno della cellula, mediante simporto di due o tre ioni sodio e un protone, mentre uno ione potassio è trasportato all'esterno. L'esatto numero di ioni sodio trasportati è ancora argomento di discussione, ma la stechiometria di tre ioni sodio per molecola di glutammato sembra generalmente favorita (Slotboom *et al.*, 1999).

Il glutammato è importante nel metabolismo cellulare batterico, in modo particolare per l'assimilazione dell'ammonio. La glutammina sintetasi combina l'ammonio con il glutammato per formare la glutammina quando la cellula cresce in un mezzo a bassa concentrazione di ammonio, mentre la glutammato deidrogenasi combina principalmente l'ammonio con l' α -chetoglutarato per formare il glutammato in un mezzo contenente alte concentrazioni di ammonio (Magasanik, 1982). Inoltre il glutammato fornisce l'azoto per la sintesi di molti aminoacidi.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che ceppi di *E. coli* K-12 e B non possono crescere in un mezzo in cui è presente il glutammato come unica fonte di carbonio e azoto. Questa loro incapacità deriva dalla ridotta attività di *uptake* del glutammato in tali condizioni. Mutanti con elevata attività di *uptake* per il glutammato possono infatti crescere in un mezzo contenente solo glutammato come fonte di energia (Halpern e Lupo, 1965).

La glutammato permeasi in *E. coli* è una proteina allosterica (Monod *et al.*, 1963) capace di legare il glutammato e altri aminoacidi, come succinato e α -chetoglutarato, ad un sito di legame differente rispetto al sito attivo. Il sito attivo riconosce solo il glutammato e alcuni dei suoi analoghi strutturali. Il legame del glutammato al sito allosterico riduce l'attività della permeasi. La transizione allosterica provocata dal legame con aspartato o α -chetoglutarato influisce sull'attività della permeasi in misura minore rispetto a quella causata dal legame con il glutammato. In un mezzo contenente glucosio, pertanto, l'attivazione e la normalizzazione dell'*uptake* del glutammato attraverso il legame di α -chetoglutarato e aspartato potrebbero essere spiegati mediante il meccanismo di competizione tra gli effettori e il substrato per il sito allosterico.

In *E. coli* K-12 il trasporto del glutammato è mediato principalmente dal trasportatore Na^+ -dipendente codificato dal gene *gltS*. Il sistema di trasporto per il glutammato consiste di tre geni: *gltC*, *gltS* e *gltR*. I tre geni *glt* costituiscono un sistema di regolazione in cui *gltR* è il gene regolatore responsabile della sintesi del repressore, *gltS* è il gene strutturale codificante la glutammato permeasi e *gltC* molto probabilmente regola la sintesi della glutammato permeasi, modulandone la sensibilità nei confronti del repressore codificato dal gene *gltR*. Dunque la sintesi della glutammato permeasi in *E. coli* è regolata attraverso un meccanismo di repressione geneticamente controllato (Marcus *et al.*, 1967). Pertanto *E. coli* non può utilizzare il glutammato come unica fonte di carbonio dato che la sintesi del trasportatore risulta parzialmente repressa.

In *E. coli* B, invece, esistono due geni codificanti due distinti sistemi di trasporto per il glutammato: *gltS*, codificante il simporto Na^+ /glutammato e *gltP*, codificante per il sistema di trasporto glutammato/aspartato, Na^+ -indipendente, *binding-protein*-indipendente. In *E. coli* B il trasporto del glutammato stimolato da Na^+ determina un aumento di affinità per il substrato.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che una regione della sequenza aminoacidica è conservata tra le strutture primarie dei seguenti sistemi di trasporto accoppiati: simporto Na^+ /prolina, cotrasporto Na^+ /glucosio e simporto Na^+ /glutammato. Questa sequenza aminoacidica potrebbe giocare un ruolo chiave nel meccanismo di riconoscimento e di legame del catione al sistema di simporto (Deguchi *et al.*, 1990).

GltT: un nuovo trasportatore per l'L-glutammato in *N. meningitidis*

Recentemente, in uno studio volto ad identificare l'esistenza di eventuali altri geni regolati da GdhR in *N. meningitidis*, è stata identificata l'esistenza di un sistema di trasporto di tipo ABC per l'L-glutammato (Monaco *et al.*, 2006), alternativo ad un sistema di simporto Na^+ /glutammato già identificato nel genoma del meningococco e denominato GltS (Tettelin *et al.*, 2000).

L'analisi del pattern trascrizionale del ceppo di sierogruppo B H44/76 *wild-type* (GdhR-proficiente) e del derivato isogenico H44/76 Ω gdhR (GdhR-difettivo), effettuata mediante una procedura di RT-PCR-DD (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction-differential display*) ha, infatti, rivelato la presenza di alcuni mRNA differenzialmente espressi tra i due ceppi. L'identità di queste sequenze geniche è stata accertata mediante analisi della sequenza nucleotidica e della mappa genetica. È stato così possibile dimostrare che GdhR controlla negativamente geni che codificano enzimi chiave del metabolismo del glucosio attraverso la via di Entner-Doudoroff, precisamente i geni dell'operon NMB1392-NMB1388, codificanti la glucosio 6-fosfato 1-deidrogenasi (NMB1392, *zwf*), la 6-fosfogluconolattasi (NMB1391, *pgl*), la glucochinasi (NMB1390, *glk*), la glucosio 6-fosfato isomerasi (NMB1388, *pgil*). Il controllo negativo esercitato da GdhR su tali geni potrebbe servire a rallentare il catabolismo del glucosio verso l'acetato quando il ciclo di Krebs risulta poco efficiente e, dunque, c'è carenza di 2-oxoglutarato.

La suddetta analisi ha, altresì, portato all'identificazione delle ORFs NMB1966-NMB1958, che costituiscono un nuovo operon in *N. meningitidis*. Analisi *in silico* effettuate dal nostro gruppo di ricerca hanno, inoltre, permesso di dimostrare che tale operon è altamente conservato tra ceppi di *N. meningitidis* appartenenti a diversi sierogruppi. Quando le sequenze dei geni relativi all'operon sono state immesse in banca dati allo scopo di avere informazioni sulla loro funzione, è stata riscontrata la loro omologia a sequenze di geni altamente conservati nei batteri Gram-negativi e negli Attinomiceti. L'elevato grado di conservazione di tali sequenze e la presenza delle stesse in batteri viventi in ristrette nicchie ecologiche (come, appunto, il meningococco), contrastava con l'annotazione iniziale di tale operon in *Pseudomonas putida*, quale operon di utilizzo del toluene. Studi *in silico* hanno suggerito, piuttosto, che l'operon NMB1966-NMB1958 codifichi per un sistema ABC di trasporto attivo dell'L-glutammato.

È stato, infatti, riscontrato un elevato grado di omologia tra la sequenza proteica dedotta della ORF NMB1966 (NMC1938) e la sequenza proteica dedotta del gene *gluA* di *Corynebacterium glutamicum*. Tale gene codifica per una proteina citoplasmatica che lega l'ATP facente parte di un sistema di trasporto ABC a quattro componenti per l'importo dell'L-glutammato.

Inoltre, la sequenza proteica dedotta della ORF NMB1965 (NMC1937) mostra omologia con la proteina simporto protoni-glutammato di *Pyrococcus horikoshii*, la cui struttura è stata determinata mediante diffrazione ai raggi X. Si tratta di una proteina integrale di membrana che presenta sei domini transmembrana, una struttura tipica della componente permeasica del sistema di trasporto ABC.

La ORF NMB1964 (NMC1936) codifica per una proteina dalla funzione sconosciuta, probabilmente una proteina esterna di membrana che lega il substrato.

La ORF NMB1963 (NMC1935) potrebbe codificare per la componente periplasmica che lega il substrato.

La piccola proteina codificata dalla ORF NMB1962 (NMC1934) contiene un dominio STAS (*sulfate transporter and antisigma factor antagonist*), un dominio che sembra avere la funzione generale di legare gli NTP. La presenza di un dominio di legame per gli NTP nella porzione citoplasmatica dei trasportatori anionici suggerisce che tali trasportatori possano essere regolati dai livelli intracellulari di GTP e di ATP (Aravind *et al.*, 2000). Una funzione simile potrebbe essere attribuita alla proteina codificata dalla ORF NMB1962.

Questi dati hanno, pertanto, permesso di ipotizzare che l'operon NMB1966-NMB1958 codifichi per un sistema di trasporto coinvolto nell'uptake dell'L-glutammato, ipotesi, per altro, avallata dall'evidenza che GdhR è responsabile della regolazione coordinata dell'espressione sia di *gdhA* che di quest'operon. L'operon NMB1966-NMB1958 è stato, pertanto, denominato GltT (trasportatore dell'L-glutammato); studi funzionali hanno, successivamente, confermato l'ipotesi secondo cui tale operon codifichi per un sistema ABC di trasporto attivo dell'L-glutammato.

Sono, infatti, stati effettuati saggi di *uptake* dell'L-glutammato nel ceppo H44/76 *wild-type* e nel mutante isogenico H44/76 Ω NMB1965, nel quale è stato inattivato il gene codificante la permeasi del sistema di trasporto ABC. Come in altri microrganismi, l'efficienza dell'importo dell'L-glutammato è ampiamente influenzata dalla concentrazione del sodio. Il mutante H44/76 Ω NMB1965 esibisce, rispetto al ceppo H44/76 *wild-type* una severa diminuzione dell'*uptake* dell'L-glutammato in un *range* tra 0 e 40mM NaCl; il difetto di *uptake* diventa modesto ad una concentrazione di sodio di circa 40mM e scompare ad una concentrazione di sodio di circa 60mM, suggerendo che, in queste condizioni sperimentali, diventi predominante l'attività del trasportatore GltS.

Una caratteristica peculiare dell'operon GltT di *N. meningitidis* è la presenza di quattro ORFs aggiuntive (NMB1961-NMB1958) localizzate a valle delle ORFs NMB1966-NMB1962 codificanti il sistema di trasporto di tipo ABC.

È di rilievo il fatto che la ORF NMB1961 (NMC1933) codifichi per una proteina che mostra omologia alla proteina VacJ di *Shigella flexneri*. Si tratta di una lipoproteina esposta sulla superficie batterica e necessaria per la diffusione cellula-cellula di questo microrganismo. Alla luce di questa osservazione non è, pertanto, azzardato ipotizzare un possibile coinvolgimento dell'operon GltT nell'invasione cellulare e nella sopravvivenza intracellulare. È da sottolineare, a tale proposito, che lo stesso operon sia stato isolato, in maniera indipendente, anche attraverso lo *screening*, condotto in parallelo dallo stesso gruppo di ricerca, per l'identificazione di geni di meningococco selettivamente trascritti nell'ambiente intracellulare.

Sono, pertanto, stati effettuati saggi di invasione cellulare e di persistenza intracellulare dei ceppi H44/76^{wt} e dei mutanti isogenici H44/76ΩgdhR, H44/76ΩNMB1965 (permeasi-difettivo), H44/76ΩNMB1961 (VacJ-like-difettivo). I risultati ottenuti hanno indicato l'assenza di differenze statisticamente rilevanti nella capacità di invadere le cellule HeLa tra i quattro ceppi. Esiste, tuttavia, una significativa differenza nella vitalità intracellulare tra il ceppo *wild-type* ed i mutanti. Normalmente, dopo due ore dal trattamento con gentamicina, si verifica una diminuzione nella vitalità batterica intracellulare, il che è una caratteristica comune anche all'invasione del gonococco (Shaw e Falkow, 1988; Williams *et al.*, 1998). Tale diminuzione è stata valutata di 6 volte per il ceppo H44/76^{wt}, 20 volte per il ceppo H44/76ΩNMB1965 (permeasi-difettivo), 18 volte per il ceppo H44/76ΩNMB1961 (VacJ-like-difettivo), e 43 volte per il ceppo H44/76ΩgdhR.

Esperimenti di *slot blot* e di *real-time* PCR hanno, infine, permesso di dimostrare che i livelli di trascritti, nell'ambiente intracellulare, dei geni NMB1961, NMB1964 e NMB1965 sono significativamente più bassi nel ceppo H44/76ΩgdhR, rispetto al ceppo *wild-type*, il che è in accordo con la minore *fitness* di tale ceppo nell'ambiente intracellulare (Monaco *et al.*, 2006).

L'operon GltT è, pertanto, trascrizionalmente indotto nell'ambiente intracellulare ed è essenziale per la sopravvivenza del meningococco in tale ambiente.

All'interno della cellula, il meningococco, infatti, non ha accesso al glucosio poiché questo viene rapidamente fosforilato dalla cellula a glucosio-6-fosfato, un substrato che, come gli altri intermedi della via glicolitica, non può essere assimilato dai meningococchi. Le migliori fonti intracellulari di carbonio sono il piruvato, il lattato ed alcuni aminoacidi, come l'L-glutammato, che stimola il catabolismo del citrato (Hill, 1971). In condizioni fisiologiche la concentrazione extracellulare di questo aminoacido va da 30 a 90 μM nel plasma, in funzione dell'alimentazione, dell'esercizio fisico e dei ritmi circadiani (Fernstrom *et al.*, 1979; Tsai *et al.*, 1999). La concentrazione intracellulare può, invece, essere considerevolmente più alta, ma dipende dal tipo e dal metabolismo cellulare (Kovacevic e McGivan, 1983; Tsai *et al.*, 1999).

L'ambiente intracellulare è caratterizzato da una concentrazione di sodio bassa (tra 15 e 20mM); diversamente, la concentrazione di sodio è molto alta nell'ambiente extracellulare e nel plasma (tra 130 e 150mM). Nell'ambiente intracellulare, a bassa concentrazione di sodio, ma ad alta concentrazione di L-glutammato, diventa, così, indispensabile l'attività del trasportatore GltT, sodio-indipendente, al fine di supportare l'attività del ciclo degli acidi tricarbossilici.

Se questa ipotesi, scaturita da dati ottenuti con un sistema di infezione cellulare *in vitro*, fosse esatta, l'operon GltT giocherebbe un ruolo essenziale nella virulenza del meningococco.

Obiettivo del presente lavoro è stato, pertanto, verificare la suddetta ipotesi utilizzando un modello di infezione animale in *outbred mice*, messo a punto nel nostro laboratorio.

SCOPO DELLA RICERCA

Lo sviluppo di modelli animali per lo studio dei fattori di patogenicità e per la comprensione dei meccanismi che ne regolano l'espressione nell'ambiente dell'ospite è prerequisito indispensabile per la ricerca scientifica finalizzata allo sviluppo di nuovi interventi di prevenzione, diagnosi e trattamento delle malattie infettive.

Sebbene questo tipo di studio sia stato eseguito con successo per alcuni microrganismi patogeni per l'uomo ed abbia portato alla scoperta di specifici fattori di virulenza ed alla caratterizzazione di alcuni meccanismi alla base del *cross-talk* tra il batterio e la cellula ospite, tale approccio è ancora in una fase abbastanza iniziale nel caso di *N. meningitidis*, a causa della particolare biologia del suo ciclo infettivo.

Il presente lavoro si inserisce nell'ambito di un progetto sperimentale avente lo scopo di identificare i geni implicati nella patogenicità di *N. meningitidis*, un microrganismo che, sebbene sia presente nel tratto nasofaringeo ed orofaringeo di molti soggetti sani, può essere occasionalmente responsabile di gravi quadri patologici.

Recentemente è stato sviluppato un modello di meningite pneumococcica basato sull'inoculazione dei batteri nel cervello del topo attraverso il bregma (*intracerebral-bregma route*) (Chiavolini *et al.*, 2004). Ottimizzando questo sistema sperimentale, nel presente lavoro, abbiamo, pertanto, inteso sviluppare un modello di meningite meningococcica in *outbred mice* che possa servire per l'identificazione e lo studio di eventi genetici e molecolari responsabili dell'acquisizione di caratteri di patogenicità in *N. meningitidis*.

La recente evidenza dell'esistenza, in *N. meningitidis*, di due sistemi di trasporto per l'L-glutammato, attivi a diverse concentrazioni di sodio, lascia ipotizzare un loro possibile coinvolgimento nell'adattamento del meningococco ai diversi microambienti dell'ospite, intracellulare ed extracellulare. Il trasportatore GltS, sodio-dipendente, ad alta affinità, è probabilmente importante nell'ambiente extracellulare; il trasportatore GltT, ATP-

dipendente, a minore affinità ma saturato a concentrazioni più elevate di L-glutammato è verosimilmente essenziale nell'ambiente intracellulare, povero di sodio. All'interno della cellula, il meningococco, non avendo accesso al glucosio (rapidamente fosforilato dalla cellula), utilizzerebbe l'L-glutammato, prodotto del catabolismo della L-glutammina, come fonte di carbonio e di azoto. Se questa ipotesi fosse esatta l'operon GltT giocherebbe un ruolo essenziale nella virulenza del meningococco.

Obiettivo del presente lavoro è stato, pertanto, analizzare il ruolo funzionale e patogenetico dei due diversi trasportatori per l'L-glutammato nel modello di infezione animale in *outbred mice*, da noi messo a punto.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e condizioni di crescita

In questo studio sono stati utilizzati i ceppi di meningococco CF5C, sierogruppo C, e 93/4286, sierogruppo C, linea ipervirulenta ET-37. Il ceppo 93/4286, ben caratterizzato genotipicamente e fenotipicamente, è stato scelto come riferimento per la messa a punto del modello murino di meningite meningococcica.

I ceppi di meningococco sono stati coltivati su terreno complesso agar cioccolato (Becton-Dickinson), o su agar GC o in brodo GC supplementato con l'1% (v/v) di Polyvitox (Bio-Merieux, contenente Vitamina B₁₂ 0.1mg; L-glutamina 100mg; Adenina SO₄ 10mg; Guanina•HCl 0.3mg; Acido p-aminobenzoico 0.13mg; L-cisteina 11mg; NAD 2.5mg; Cocarbossilasi 1mg; Nitrato ferrico 0.2mg; Tiamina•HCl 0.03mg; Cisteina•HCl 259mg; Destrosio 1g) a 37°C in presenza di CO₂ al 5%.

Il ceppo di *E. coli* DH5α [F'Φ80d *lacZ*ΔM15 *endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 λ⁻ gyrA96* Δ(*lacZYA-argF*)U169] è stato utilizzato nelle procedure di clonaggio. Le cellule di *E. coli* sono state coltivate su terreno Luria-Bertani (LB) con aggiunta di ampicillina (50 μg ml⁻¹) quando richiesto.

Ceppi murini

Gli animali utilizzati in questo studio sono topi *outbred* femmine, immunologicamente maturi (8-9 settimane), di circa 25-30g, appartenenti al ceppo CD1. Gli animali sono stati forniti dalla Harlan Nossan (Corezzana, Milano); sono stati lasciati liberi di adattarsi al nuovo ambiente per una settimana prima di effettuare l'esperimento e si è loro fornito cibo ed acqua *ad libitum* per tutta la durata degli esperimenti.

Preparazione della dose d'infezione

Per la preparazione della dose d'infezione, i ceppi di meningococco sono stati cresciuti in terreno liquido GC fino ad una densità ottica di circa 1.0 unità a 550 nm e, quindi, aliquotati e conservati a -80°C in GC glicerato al 10%. Prima dell'infezione, la sospensione batterica è stata sciolta a temperatura ambiente, le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 2500 rpm per 15 minuti e risospese in terreno liquido GC alle opportune diluizioni. Le conte batteriche effettivamente utilizzate per l'infezione sono state determinate effettuando diluizioni seriali della sospensione iniziale in terreno liquido GC e piastrando su agar GC per determinare il numero di cfu vitali.

Tecnica d'infezione

La tecnica di infezione utilizzata si basa sull'inoculo dei batteri nello spazio subaracnoideo dei topi (inoculo intracranico/subaracnoideo) ed è stata modificata a partire da un metodo precedentemente usato per indurre meningite da *Streptococcus pneumoniae* (Chiavolini *et al.*, 2004)

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati su topi blandamente anestetizzati (ketamina 50mg kg⁻¹; xylazina 3mg kg⁻¹). Gli animali sono stati immobilizzati manualmente e sono stati inoculati per via intracranica (i.c.) ad una profondità di circa 2mm attraverso un punto molle della scatola cranica localizzato a 3.5mm dal bregma, in senso rostrale.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati iniettando un volume di 50µl di sospensione batterica e 1µl di destrano ferrico (100µg/topo). Per l'iniezione sono state utilizzate siringhe da insulina BD-Micro-Fine 0.3ml (1/2 U) 0.30mm (30G) x 8mm (Becton Dickinson, Buccinaso, Milano) in cui la lunghezza dell'ago è stata controllata con l'ausilio di guarnizioni in lattice.

Circa 2 ore prima dell'infezione, a ciascun animale è stata effettuata un'iniezione intraperitoneale (i.p.) di destrano ferrico (Sigma) 250mg kg⁻¹.

Saggio di *survival*

Per il saggio di *survival*, gli animali, in gruppi di 6, sono stati infettati con un titolo di batteri compreso tra 10⁶ e 10⁷ cfu/topo del ceppo 93/4286 *wild-type* e dei ceppi ricombinanti 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS. I topi di controllo sono stati inoculati con 50μl di terreno liquido GC. Gli animali sono stati monitorati tre volte al giorno per la valutazione dei parametri clinici di progressione della malattia (peso e temperatura corporei, rigonfiamento del pelo, fotofobia, letargia) ed è stata osservata la sopravvivenza nel tempo. I saggi di *survival* si sono protratti per 10 giorni (240 ore).

Analisi microbiologica ed istologica

Per le analisi istologiche e microbiologiche sono stati utilizzati diversi campioni.

Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca effettuata prima del sacrificio e subito riposto in tubi contenenti sodio citrato 3.8%. Gli animali sono, quindi, stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e sono stati prelevati diversi campioni. Il cervello, la milza e il fegato sono stati omogenati in 1ml PBS 1X. La conta batterica è stata effettuata piastrando diluizioni seriali su agar GC.

Per l'analisi istopatologica l'encefalo e la milza, prelevati dopo l'infezione, sono stati fissati immediatamente in formalina tamponata per un periodo non inferiore a 24 ore. L'encefalo è stato interamente sezionato secondo un piano sagittale. La milza è stata sezionata longitudinalmente. I tessuti sono stati processati e quindi inclusi in OCT

(Kalttek). I blocchi tissutali sono stati tagliati al criostato (Leica 1900) ottenendo sezioni dello spessore di 5µm e colorati con ematossilina-eosina secondo la tecnica standard (Morawietz *et al.*, 2004).

Le modificazioni tissutali indotte sperimentalmente sono state valutate grazie all'osservazione microscopica. Nel tessuto cerebrale la presenza e l'intensità dell'infiltrato infiammatorio acuto di tipo granulocitario è stata valutata a livello meningeo, intraparenchimale e a livello delle cavità ventricolari. A livello splenico l'iperplasia della polpa bianca è stata valutata in base all'espansione dei follicoli linfatici ed alla comparsa dei centri germinativi.

Per evidenziare le specie batteriche presenti nel cervello è stata eseguita l'immunofluorescenza. Per colorare i batteri extracellulari, le sezioni di cervello sono state incubate prima con antisiero anti-*N. meningitidis* 6121 (*Rabbit*) (ViroStat) per 60 minuti a temperatura ambiente, poi con IgG secondario anti-*Rabbit* coniugato con tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC) (R0156, Dako) per 60 minuti a temperatura ambiente.

Per individuare i batteri intracellulari, le sezioni colorate con TRITC sono state permeabilizzate tramite trattamento con Saponina 0.25% (Sigma) in PBS 1X per 10 minuti a temperatura ambiente e sono state incubate prima con antisiero anti-*N. meningitidis* 6121 diluito in Saponina 0.25%/PBS per 60 minuti a temperatura ambiente, poi con IgG anti-*Rabbit* coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (F0205, Dako) diluito in Saponina 0.25%/PBS per 60 minuti a temperatura ambiente (Makino *et al.*, 1991).

L'anticorpo primario è stato diluito 1:500 prima dell'uso, gli anticorpi secondari sono stati diluiti 1:200. Le immagini sono state acquisite usando un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioskop2 plus).

Saggio di coinfezione e valutazione dell'indice di competizione

Per il saggio di coinfezione è stato utilizzato il ceppo 93/4286^{wt} e il ceppo isogenico 93/4286ΩglT. Prima dell'infezione le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 2500 rpm per 15 minuti e risospese in terreno liquido GC fino ad una concentrazione calcolata di 2×10^7 . I due ceppi sono, quindi, stati miscelati in un rapporto di 1:1 e le conte batteriche utilizzate per l'infezione sono state determinate effettuando diluizioni seriali della sospensione iniziale in terreno liquido GC e piastrando su agar GC e su mezzo selettivo agar GC addizionato con eritromicina $7\mu\text{g ml}^{-1}$ (*input*).

Gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale dopo 6, 24 e 48 ore dall'infezione; il cervello, la milza e il fegato sono stati espianati ed omogenati in 1ml PBS 1X. Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca effettuata prima del sacrificio e subito riposto in tubi contenenti sodio citrato 3.8%. Le conte batteriche sono state effettuate piastrando in parallelo diluizioni seriali su agar GC e su agar GC selettivo addizionato con eritromicina $7\mu\text{g ml}^{-1}$ per distinguere tra i ceppi (*output*).

L'indice di competizione (CI) è stato calcolato dal rapporto tra il ceppo isogenico e il ceppo *wild-type* nella sospensione batterica *output* rispetto al rapporto tra i due ceppi nella sospensione batterica *input*.

Analisi statistiche

La valutazione della LD₅₀ è stata effettuata utilizzando sia il metodo di Reed e Muench (Reed e Muench, 1938) che le analisi Probit (Finney, 1971), con un intervallo di confidenza del 95%. Il *survival* tempo dipendente è stato analizzato con la curva di Kaplan-Meier.

L'indice di competizione è stato analizzato utilizzando il test di t-Student.

Trasformazione dei meningococchi

Le colonie di meningococco ottenute da crescita su terreno agar GC per una notte, sono state raccolte e risospese in mezzo PPM (*Proteose Peptone medium*), addizionato con Polivitox all'1%, NaHCO_3 5mM e MgCl_2 10mM, fino ad una densità ottica (a 550 nm) pari a 0.1 unità (Frosch *et al.*, 1990). Ad 1ml della sospensione batterica sono stati aggiunti da 500ng a 1 μg di DNA plasmidico. La sospensione è stata incubata in agitazione vigorosa a 37°C per 4 ore. I trasformanti sono stati selezionati mediante piastramento su agar GC contenente eritromicina 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$, incubando le piastre a 37°C in presenza di CO_2 al 5% per 20 ore.

Estrazione e purificazione del DNA cromosomale da ceppi di *N.*

meningitidis

I ceppi di meningococco sono stati cresciuti in terreno liquido GC fino ad una densità ottica di circa 1.0 unità a 550nm. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 3500 rpm per 20 minuti e sono state risospese in 4ml di Tris-glucosio 50mM pH 8. La lisi batterica è stata effettuata aggiungendo lisozima 1mg ml^{-1} ; dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente sono stati aggiunti EDTA 25mM pH 8 e SDS 1%. Ottenuta la lisi batterica, è stata effettuata la digestione delle proteine mediante trattamento con Proteinasi K (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) alla temperatura di 55°C per 2 ore. L'estrazione del DNA dalle proteine e dai componenti batterici lipofilici è stata realizzata mediante trattamento fenolo/cloroformio. La precipitazione del DNA cromosomale è stata effettuata con sodio acetato 3M pH 6.6 e 2.5 volumi di etanolo 100%. Il DNA è stato quindi risospeso in Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM pH 8 ed RNAasiA 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Procedure di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

Gli oligonucleotidi utilizzati in questo studio come *primers* nelle reazioni di PCR sono i seguenti:

NMB1965-1: 5'-GTTGCCGTTTCGGGGCTGTTTGTCTGGCATGGTCTTGG-3'

NMB1965-2: 5'-GCAATGGAAGCCCTGATGCACGGCAATCAGCGTTA-3'

NMCgltS-1: 5'-GGGTTTGGATCCGCTCATCGGTCTGATTAC-3'

NMCgltS-2: 5'-CCGGTCGGATCCCACAGTTTCAAATTCAGCAACG-3'

Gli ampliconi di 546 bp (*gltS*) e di 482 bp (*gltT*) sono stati ottenuti mediante reazioni di amplificazione che consistono di 30 cicli, comprendenti 1 minuto a 94°C (*denaturation*), 1 minuto a 60°C (*annealing*) e 1-2 minuti a 72°C (*extension*). Tali reazioni sono state eseguite in un apparecchio Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480.

Analisi del DNA batterico tramite Southern blot

Il DNA cromosomale estratto dai ceppi di *N. meningitidis* è stato trattato con appropriati enzimi di restrizione ed i prodotti della digestione sono stati separati elettroforeticamente utilizzando gel di agarosio 0.8% in TBE 1X (TBE 1X: Tris-borato 8.9mM, acido borico 89mM, EDTA 2mM).

Il DNA è stato trasferito su supporto di Nylon attivato (Hybond N⁺) mediante blot alcalino in presenza di SSC 10X (SSC 1X: 15mM NaCl, 15mM Sodio citrato pH 7). La reazione di ibridazione è stata effettuata utilizzando la soluzione *Church* 0.5M (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.2 e SDS 7%) in agitazione a 65°C per una notte. Alla reazione di ibridazione è stata poi aggiunta la sonda marcata con [α -³²P]-GTP (3000Ci mmol⁻¹) tramite *random priming*

utilizzando il frammento Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli* come da protocolli standard (Sambrook e Russel, 2001).

La quantità di sonda aggiunta è stata calcolata in base all'attività specifica della stessa.

Per eliminare l'eccesso di sonda i filtri sono stati lavati in presenza di 40mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.2 e SDS 1% a 65°C per 30 minuti ripetendo l'operazione più volte e monitorando la radioattività attraverso un contatore *Geiger*.

I filtri sono stati quindi sottoposti ad autoradiografia.

Plasmidi e procedure di clonaggio

I plasmidi utilizzati in questo studio derivano dal vettore pDEX (Pagliarulo *et al.*, 2004), ottenuto inserendo un frammento KpnI di 860 bp, contenente il gene *ermC*, ed un frammento EcoRI di 382 bp, contenente la sequenza DUS (DNA uptake sequence) di *Neisseria*, rispettivamente nei siti KpnI ed EcoRI del vettore pUC19. I frammenti KpnI di 860 bp ed EcoRI di 382 bp derivano dal plasmide pNDE1 (Bucci *et al.*, 1999).

Il plasmide pDEΔgltS è stato ottenuto inserendo, nel sito BamHI del vettore pDEX, un frammento di 546bp corrispondente alla regione centrale del gene *gltS* di sierogruppo C ottenuto per amplificazione del DNA genomico con gli oligonucleotidi NMCgltS-1 e NMCgltS-2 e digerito con l'enzima di restrizione BamHI. Lo stesso frammento è stato utilizzato come sonda negli esperimenti di Southern blot.

Analogamente, il plasmide pDEΔNMB1965 (Monaco *et al.*, 2006), da ora denominato pDEΔgltT, è stato ottenuto inserendo, nel sito BamHI del vettore pDEX, un frammento di 482bp corrispondente alla regione centrale del gene *gltT* ottenuto per amplificazione del DNA genomico con gli oligonucleotidi NMB1965-1 e NMB1965-2 e digerito con l'enzima BamHI. Lo stesso frammento è stato utilizzato come sonda negli esperimenti di Southern blot.

RISULTATI

Modello murino di meningite meningococcica

Ad oggi nessuno dei modelli animali di meningite meningococcica è stato in grado di riprodurre l'intera sequenza degli eventi infettivi che caratterizzano la malattia meningococcica così come descritti nel suo ospite naturale. Recentemente l'inoculo dei batteri nel cervello del topo attraverso il bregma ha dimostrato la sua efficacia nell'induzione della meningite pneumococcica (Chiavolini *et al.*, 2004). Nel presente lavoro, abbiamo, pertanto, inteso ottimizzare questo sistema sperimentale per adattarlo allo studio della meningite meningococcica.

Topi *outbred* CD1 sono, quindi, stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con un volume totale di 50µl di sospensione batterica. Il ceppo murino CD1 è particolarmente suscettibile all'infezione con *S. pneumoniae* ed esistono evidenze preliminari che esso possa essere adatto anche per l'induzione della malattia meningococcica. Due ore prima dell'infezione ciascun animale ha ricevuto un'iniezione intraperitoneale di destrano ferrico (250mg kg⁻¹). È riportato in letteratura che il pretrattamento con destrano ferrico favorisce l'instaurarsi dell'infezione meningococcica nell'ospite murino (Holbein, 1980, Holbein *et al.*, 1979).

Siccome la manipolazione di ceppi virulenti di meningococco *in vivo* pone problemi di sicurezza ulteriori rispetto alla manipolazione degli stessi ceppi *in vitro*, nella fase iniziale di messa a punto del modello sono stati utilizzati ceppi virulenti di sierogruppo C, per i quali è disponibile un vaccino efficace; in un secondo momento gli studi potranno essere estesi a ceppi di sierogruppo B. In particolare sono stati utilizzati i ceppi 93/4286, linea ipervirulenta ET-37, e CF5C.

È stata, quindi, effettuata un'analisi preliminare di *survival* dose-dipendente ed è stata calcolata la dose letale per il 50% degli animali (LD_{50}). Sono state utilizzate dosi batteriche comprese tra 10^2 e 10^7 cfu/topo ed è stata osservata la sopravvivenza nel tempo.

Il profilo di *survival* dei topi infettati con i ceppi 93/4286 e CF5C è del tutto paragonabile, con una LD_{50} di 1.8×10^7 e 2.1×10^7 rispettivamente.

Per caratterizzare in dettaglio la meningite meningococcica indotta dall'inoculo intracranico/subaracnoideo, è stato, pertanto, utilizzato il ceppo 93/4286, linea ipervirulenta ET-37, ben caratterizzato genotipicamente e fenotipicamente. La linea ET-37 è, inoltre, filogeneticamente vicina alle linee virulente di sierogruppo B, il che garantisce, da un punto di vista concettuale, la trasferibilità dei risultati ottenuti ai meningococchi di sierogruppo B.

Allo scopo di valutare l'evolversi della malattia meningococcica nell'ospite murino sono stati, pertanto, effettuati saggi di *survival* dose-dipendente, conte batteriche in diversi organi e tessuti e analisi istopatologiche di cervello e milza degli animali infettati.

Profilo di *survival* degli animali infettati con il ceppo di *N. meningitidis*

93/4286^{wt}

Una volta stabilita la dose infettiva da utilizzare, sono stati condotti esperimenti mirati ad uno studio dettagliato delle caratteristiche della malattia indotta. Per i saggi di *survival*, 2 gruppi di topi CD1 sono stati infettati con un titolo di batteri compreso tra 10^6 e 10^7 cfu/topo. La percentuale di animali sopravvissuti a ciascuna dose di infezione è stata analizzata con la curva di Kaplan-Meier.

Dopo l'inoculo di un titolo di batteri di 10^6 cfu, solo due topi dei sei infettati sono morti nell'arco di 132 ore dall'infezione (66.6% *survival*). Alla dose di 10^7 cfu, un topo è morto a 24 ore, mentre due sono morti a 48 ore, con un 50% di *survival* (Fig. 9).

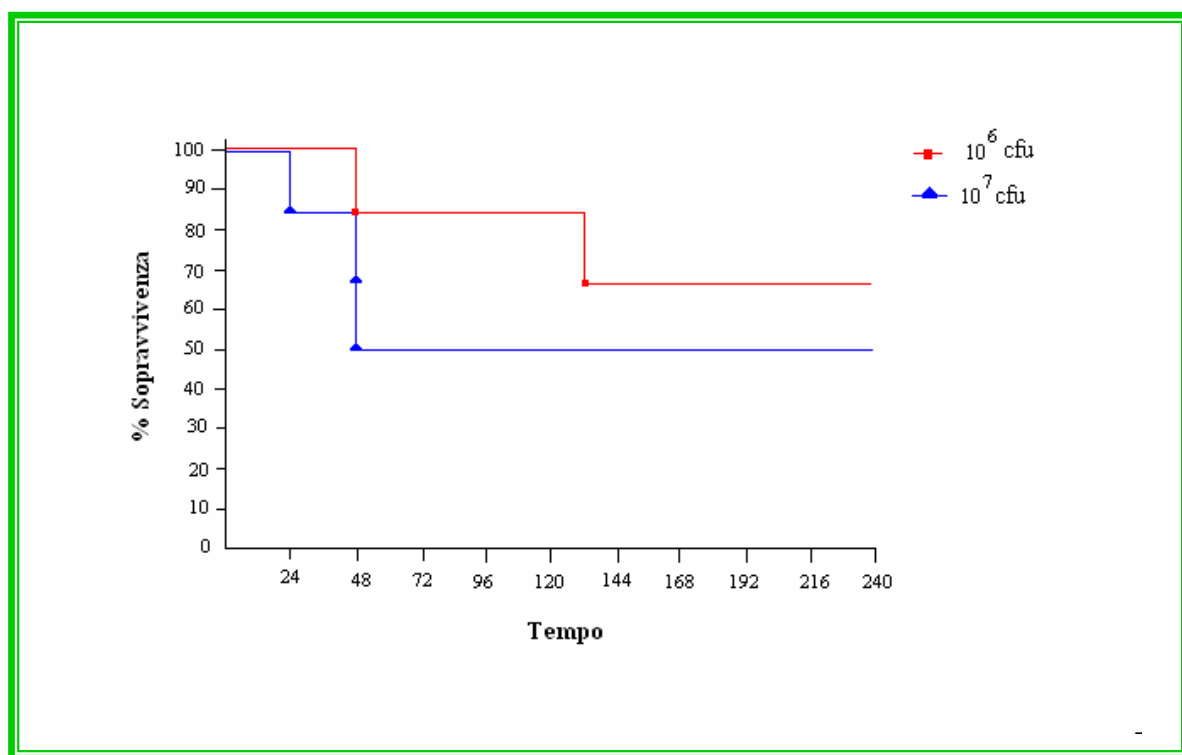


Figura 9. Curva di sopravvivenza Kaplan Meier dei topi infettati con il ceppo 93/4286^{wt}

Due gruppi di topi sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con due diverse dosi del ceppo di *N. meningitidis* 93/4286^{wt}. Gli animali sono stati monitorati per 10 giorni ed è stata registrata la sopravvivenza. I risultati sono espressi come percentuale di sopravvivenza in funzione del tempo.

Conte batteriche nell'ospite animale dopo l'infezione con il ceppo di *N.*

meningitidis 93/4286^{wt}

Per stabilire il titolo di batteri nel sangue gli animali, infettati con un titolo batterico di 10^7 cfu/topo, sono stati sacrificati a diversi tempi d'infezione (6, 24, 48 ore) e sono stati prelevati il cervello, la milza e il fegato. Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca effettuata prima del sacrificio. La conta batterica è stata calcolata come cfu/ml di sangue o cfu/organo in funzione del tempo post-infezione.

Gli animali, dopo 24 ore dall'inoculo della sospensione batterica, hanno mostrato conte batteriche paragonabili nel cervello ($3.4 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^6$ cfu/organo). Le conte batteriche nel sangue ($7.3 \times 10^4 \pm 7.2 \times 10^4$ cfu/ml), nella milza ($3.6 \times 10^3 \pm 6.3 \times 10^3$ cfu/organo) e nel fegato ($4.6 \times 10^4 \pm 8 \times 10^4$ cfu/organo) indicano che si verifica disseminazione dei meningococchi dal cervello verso gli organi vitali e che tale disseminazione è paragonabile in tutti gli animali (Tabella 1). I valori non più rilevabili dei titoli batterici nel sangue, nella milza e nel fegato a 48 ore dall'inoculo intracranico/subaracnoideo indicano che gli animali che sopravvivono riescono a risolvere l'infezione sistemica. Diversamente, nel sito di infezione (cervello) non si ha *clearance* nemmeno a 48 ore dall'infezione.

Ceppo 93/4286 ^{wt}				
	CERVELLO	SANGUE	MILZA	FEGATO
6 ore	$1.2 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$	$2.4 \times 10^3 \pm 1.9 \times 10^3$	$6.8 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^4$
24 ore	$3.4 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^6$	$7.3 \times 10^4 \pm 7.2 \times 10^4$	$3.6 \times 10^3 \pm 6.3 \times 10^3$	$4.6 \times 10^4 \pm 8 \times 10^4$
48 ore	$3.1 \times 10^4 \pm 2.8 \times 10^4$	N. R.	N. R.	N. R.

Tabella 1. Conte batteriche del ceppo 93/4286^{wt} nel sangue e in campioni di omogenato di cervello, milza e fegato, dopo 6, 24 e 48 ore dall'infezione.

N. R.= i valori non sono rilevabili perché al di sotto del *detection limit*.

Valutazione dei parametri clinici della meningite meningococcica

Per valutare i parametri di progressione della malattia gli animali infettati con un titolo batterico compreso tra 10^6 e 10^7 cfu sono stati monitorati tre volte al giorno, valutando la variazione di peso e temperatura corporei dopo l'infezione. Ciascun parametro è stato valutato in due esperimenti indipendenti effettuati su gruppi di 5 animali.

Dopo l'infezione, si assiste ad un significativo calo di peso corporeo, indice di uno stato di sofferenza dell'animale. Nei topi infettati con un titolo batterico di 10^6 cfu si registra una perdita di peso di circa 4gr, mentre gli animali infettati con un titolo batterico di 10^7 cfu perdono circa 6gr dopo 3 giorni dall'infezione (Fig. 10).

La variazione della temperatura corporea mostra un andamento del tutto paragonabile: in tutti gli animali dopo l'infezione è stato rilevato uno stato di ipotermia. In particolare nei topi infettati con un titolo batterico di 10^6 cfu si registra una riduzione di circa 1°C , mentre gli animali infettati con un titolo batterico di 10^7 cfu mostrano una diminuzione della temperatura corporea di circa 3°C dopo 3 giorni dall'infezione (Fig. 11).

I parametri clinici valutati indicano, quindi, uno stato di sofferenza generalizzata degli animali che mostra, per altro, un andamento significativamente dose-dipendente. Del resto, all'esame obiettivo gli animali hanno mostrato i primi segni di malattia (rigonfiamento del pelo, letargia, fotofobia) già dopo 6 ore dall'inoculo intracranico, con repentino aggravamento nel giro di poche ore. In particolare, la maggior parte degli animali infettati con le dosi batteriche più elevate è andata incontro ad uno stato di intenso torpore con quasi totale obnubilamento del sensorio; tale condizione è stata rapidamente seguita dalla morte dell'animale. L'andamento dei parametri clinici valutati indica, quindi, uno stato di malessere degli animali che persiste nonostante i valori non più rilevabili dei titoli batterici nel sangue, nella milza e nel fegato a 48 ore dall'inoculo intracranico/subaracnoideo.

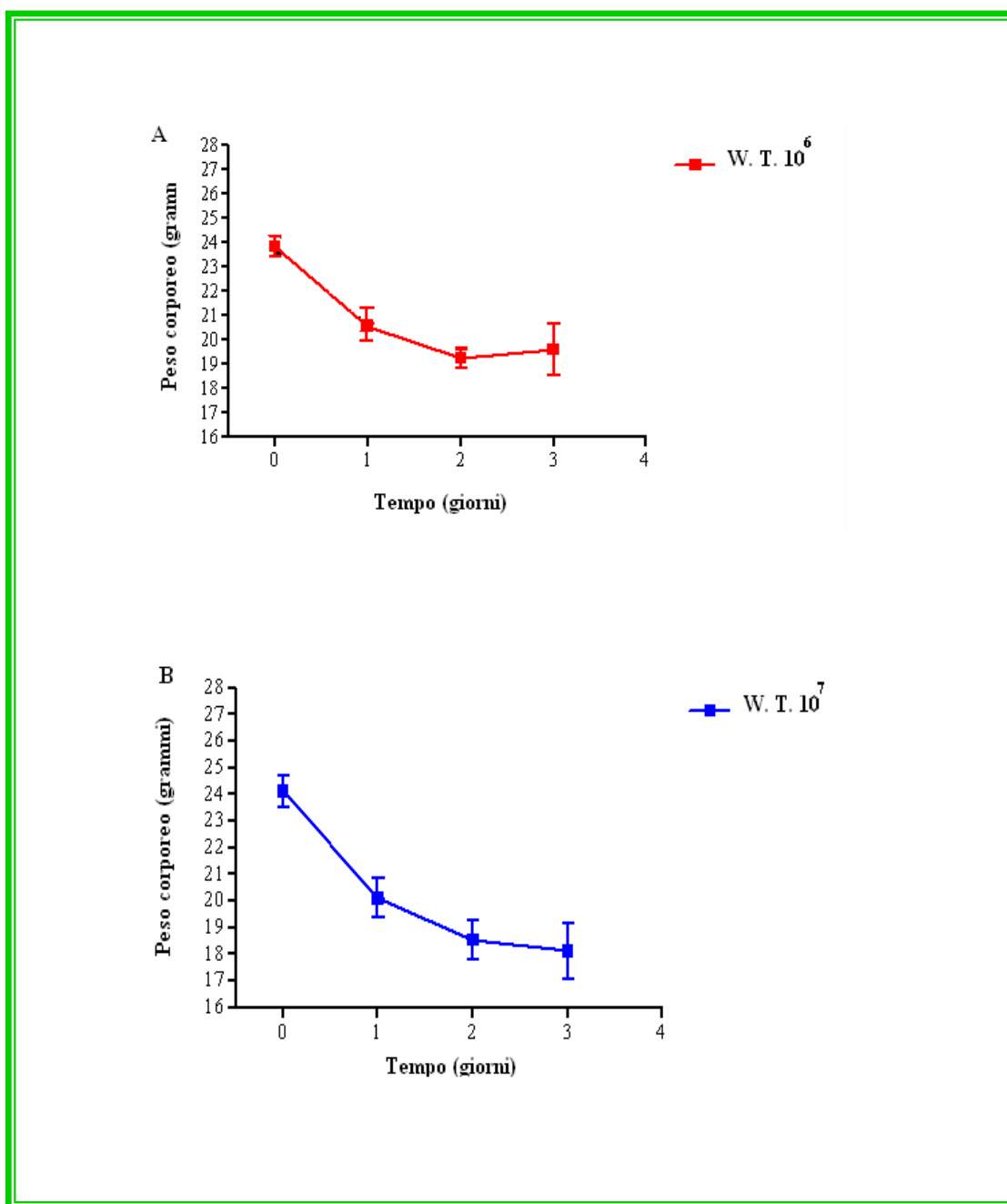


Figura 10. Valutazione del peso corporeo in topi infettati con il ceppo 93/4286^{wt}

Due gruppi di topi sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con due diverse dosi del ceppo di *N. meningitidis* 93/4286^{wt} e sono stati monitorati tre volte al giorno per valutare la variazione di peso corporeo dopo l'infezione.

I grafici illustrano i valori del peso corporeo in funzione del tempo post-infezione.

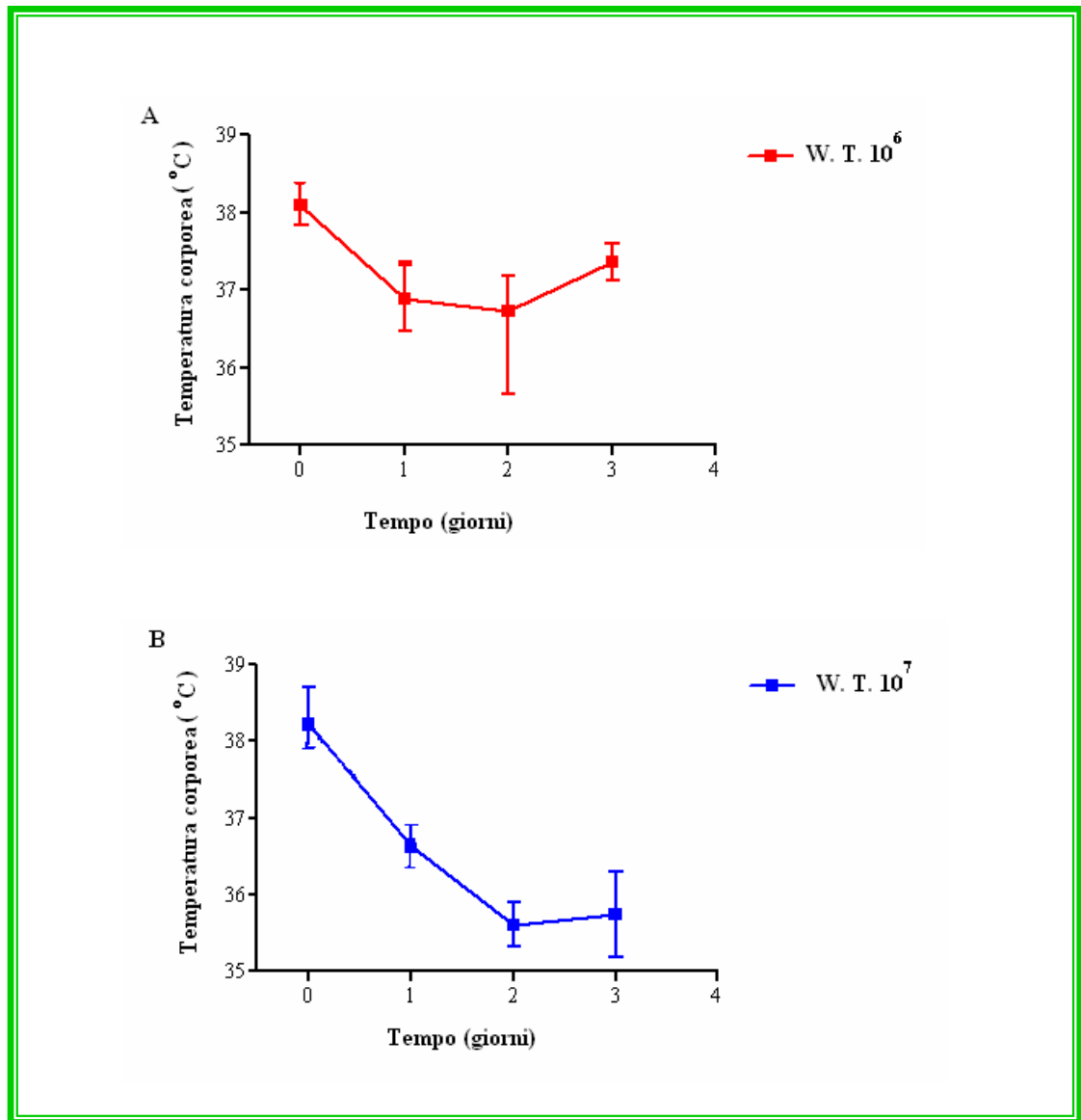


Figura 11. Valutazione della temperatura corporea in topi infettati con il ceppo 93/4286^{wt}

Due gruppi di topi sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con due diverse dosi del ceppo di *N. meningitidis* 93/4286^{wt} e sono stati monitorati tre volte al giorno per valutare la variazione di temperatura corporea dopo l'infezione.

I grafici illustrano i valori della temperatura corporea in funzione del tempo post-infezione.

Caratterizzazione istopatologica della meningite meningococcica

Per avere un quadro patologico completo è stata eseguita l'analisi istopatologica di campioni di rene, polmone, fegato, milza ed encefalo di animali moribondi infettati con un titolo batterico di 1.2×10^7 e sacrificati dopo 24 ore dall'infezione.

L'analisi istologica ha rivelato che il parenchima epatico, renale e polmonare non presenta evidenti segni flogistici (dati non mostrati).

Nel tessuto cerebrale la presenza e l'intensità dell'infiltrato infiammatorio acuto è stata valutata a livello meningeo, intraparenchimale e a livello delle cavità ventricolari. Negli animali infettati non è stato osservato ascesso cerebrale, ma solo un evidente infiltrato infiammatorio acuto di tipo granulocitario a livello degli spazi subaracnoidali e ventricolari. In particolare, un esteso accumulo di neutrofili è stato osservato nello spazio leptomeningeo, in sede perivascolare e a livello subependimale, in corrispondenza dei ventricoli laterali (Fig. 12).

Diversamente, gli animali di controllo inoculati con terreno liquido GC non hanno mostrato alcun cambiamento istologico in seguito all'inoculo.

L'esame istopatologico della milza degli animali infettati con *N. meningitidis* denota una lieve iperplasia della polpa bianca, valutata in base all'espansione dei follicoli linfatici ed alla comparsa dei centri germinativi, rispetto all'organo degli animali di controllo inoculati con terreno liquido GC.

Per evidenziare le specie batteriche presenti nel cervello è stata eseguita l'immunofluorescenza. Tale analisi ha rivelato la presenza dei batteri, disposti per lo più come diplococchi, a livello sia meningeo che encefalico. I meningococchi hanno una localizzazione sia extra- che intracellulare (Fig.13).

I dati ottenuti indicano, quindi, che l'inoculo intracranico di isolati clinici di *N. meningitidis* riproduce in modo fedele in topi *outbred* le caratteristiche patogenetiche della malattia meningococcica così come descritte nel suo ospite naturale.

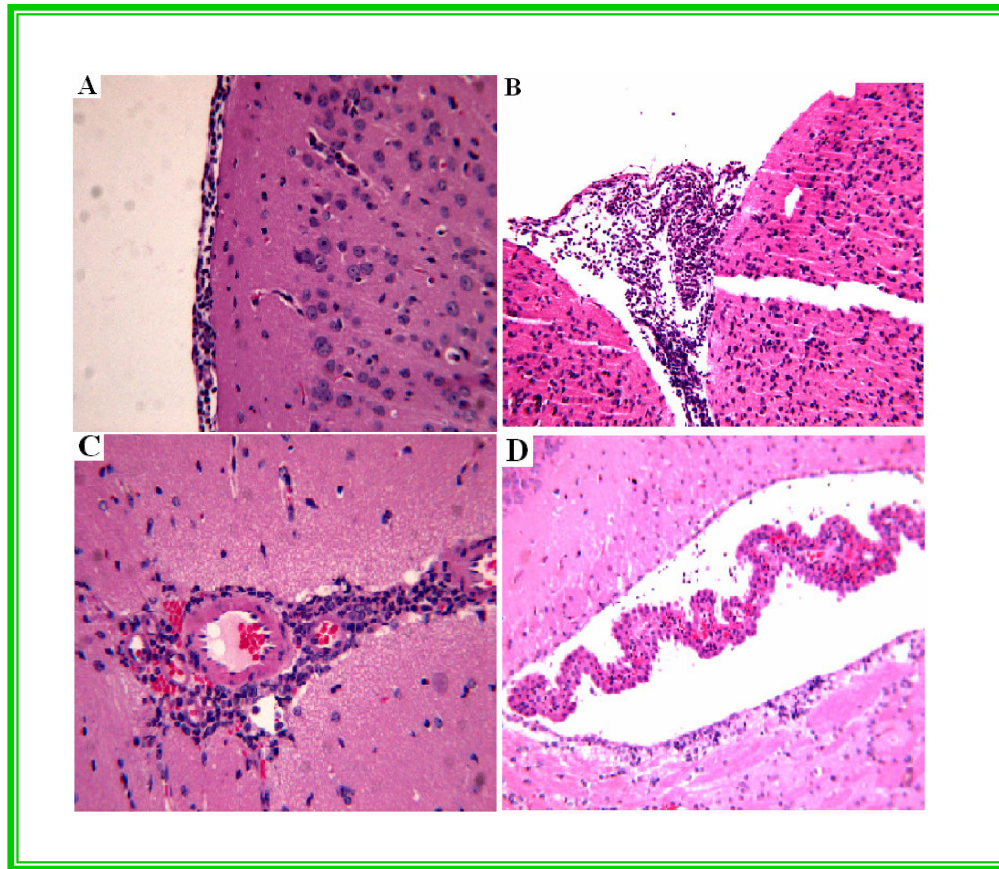


Figura 12. Analisi istologica del cervello di topi infettati con il ceppo di *N. meningitidis* 93/4286^{wt}

Topi *outbred* CD1 sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con il ceppo di *N. meningitidis* 93/4286^{wt}. Gli animali sono stati sacrificati dopo 24 ore dall'infezione; il cervello è stato prelevato, fissato in formalina, incluso in OCT e colorato con ematossilina-eosina. **A-B.** Accumulo di neutrofili nello spazio leptomeningeo. **C.** Presenza di neutrofili nello spazio perivascolare. **D.** Accumulo di neutrofili nello spazio sub-ependimale in corrispondenza del ventricolo laterale.

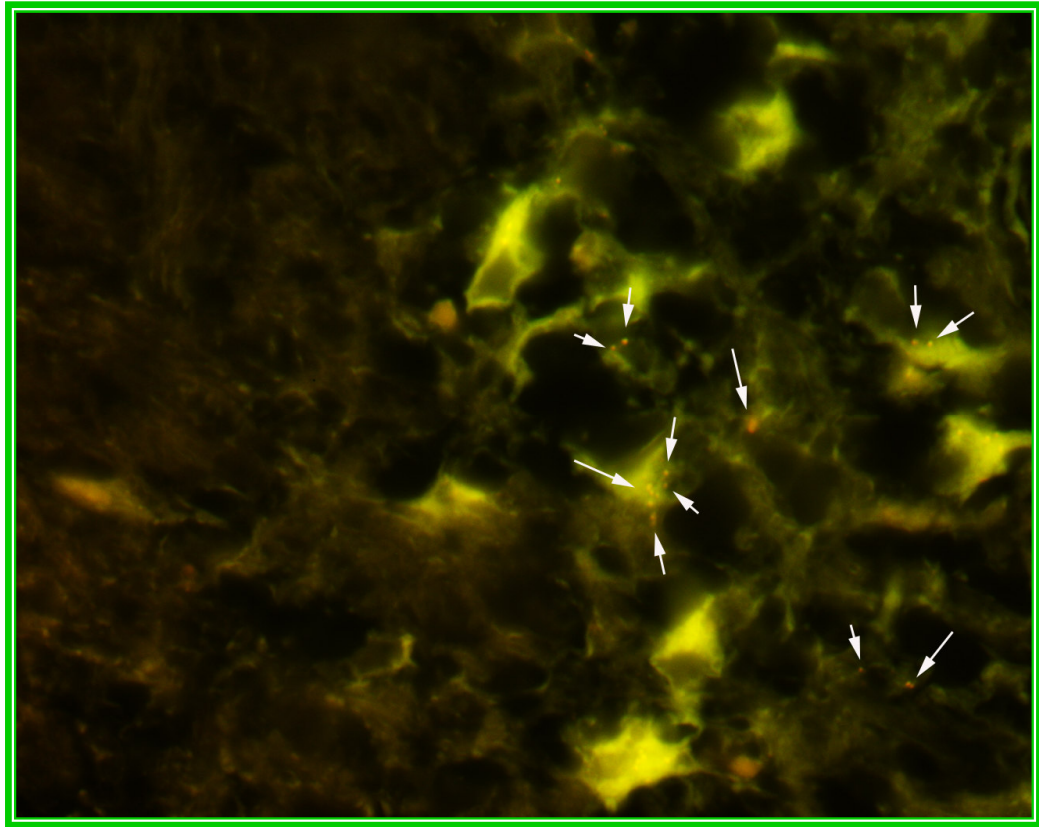


Figura 13. Microscopia a immunofluorescenza di batteri extra- ed intracellulari in sezioni di cervello di animali infettati con il ceppo 93/4286^{wt}

Le sezioni sono state colorate con antisiero anti-*N. meningitidis* (Rabbit). I batteri extracellulari sono stati evidenziati con IgG secondario anti-Rabbit coniugato con tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC). Dopo permeabilizzazione le sezioni sono state reincubate con IgG anti-Rabbit coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) per individuare i batteri intracellulari.

Le frecce localizzano i batteri, disposti principalmente come diplococchi.

Inattivazione funzionale di geni potenzialmente implicati nel processo invasivo

Per comprendere gli eventi genetici e molecolari responsabili dell'acquisizione dei caratteri di patogenicità di *N. meningitidis*, nel modello murino di meningite meningococcica da noi messo a punto è stato analizzato il ruolo funzionale del sistema di trasporto GltT per l'L-glutammato. Diversi dati preliminari, infatti, suggeriscono che tale operon sia coinvolto nella regolazione di geni necessari per l'invasione cellulare e che la sua espressione vari nei diversi microambienti in cui è prevista l'iniziale moltiplicazione dei batteri.

Il meningococco, naturalmente autotrofo per l'L-glutammato, possiede due sistemi di trasporto per tale aminoacido: il primo, sodio-dipendente, ad alta affinità, ma saturato a bassa concentrazione di L-glutammato, probabilmente importante nell'ambiente extracellulare; il secondo, ATP-dipendente, a minore affinità ma saturato a concentrazioni più elevate di L-glutammato, evidentemente essenziale nell'ambiente intracellulare, povero di sodio. All'interno della cellula, il meningococco, non avendo accesso al glucosio, rapidamente fosforilato dalla cellula, utilizzerebbe l'L-glutammato, prodotto del catabolismo della L-glutammina, come fonte di carbonio (e di azoto) insieme, probabilmente, ad altri acidi organici.

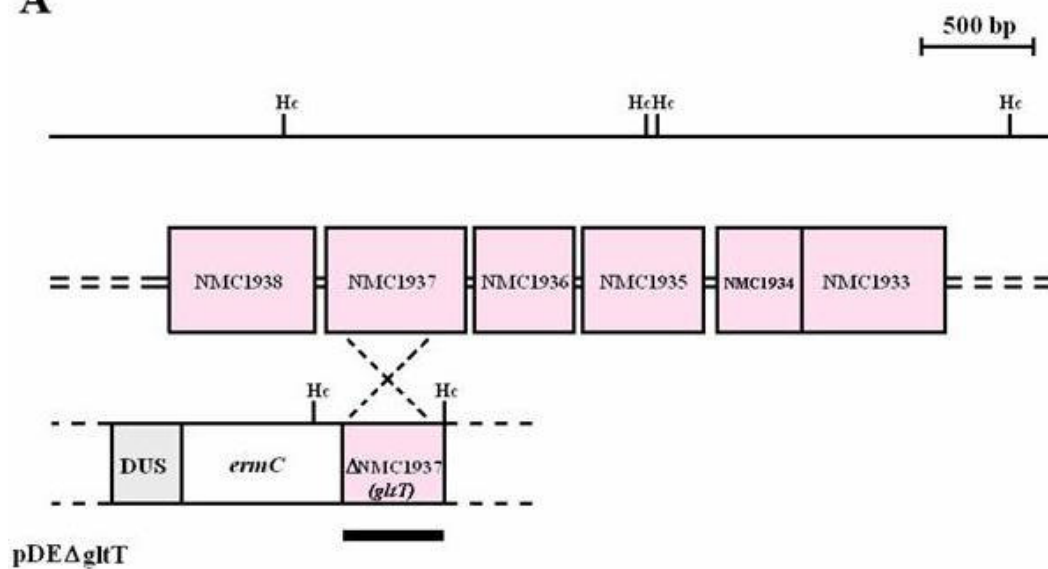
Se questa ipotesi, scaturita da dati ottenuti con un sistema di infezione cellulare *in vitro*, fosse esatta, l'operon GltT giocherebbe un ruolo essenziale nella virulenza del meningococco (Monaco *et al.*, 2006).

Allo scopo di verificare tale ipotesi nel modello murino di meningite meningococcica da noi messo a punto, sono stati costruiti i mutanti isogenici 93/4286 Ω gltT e 93/4286 Ω gltS. Nel ceppo 93/4286 Ω gltT il gene *gltT*, codificante la permeasi del sistema di trasporto GltT per l'L-glutammato sodio-dipendente, è stato inattivato inserzionalmente utilizzando il vettore pDE Δ gltT attraverso un evento di singolo *crossing-over* (Fig. 14).

Analisi di Southern blot hanno confermato l'inserzione di una cassetta di resistenza all'eritromicina, utilizzata come marcatore selettivo per l'isolamento dei trasformanti. Come risultato dell'evento di ricombinazione, due frammenti di DNA HincII, delle dimensioni attese di 1718bp e 951bp, sono osservabili mediante una sonda *gltT*-specifica nei ceppi trasformati 93/4286ΩgltT al posto del frammento HincII di 1975bp del ceppo parentale 93/4286.

Analogamente, nel ceppo 93/4286ΩgltS il gene *gltS* codificante per il simporto sodio/glutammato è stato inattivato inserzionalmente utilizzando il vettore pDEΔgltS. Come risultato dell'evento di ricombinazione, una sonda *gltS*-specifica individua due frammenti di DNA PstI delle dimensioni attese di 5135bp e 908bp nei ceppi trasformati 93/4286ΩgltS al posto del frammento PstI di 1575bp del ceppo parentale 93/4286 (Fig. 15).

A



B

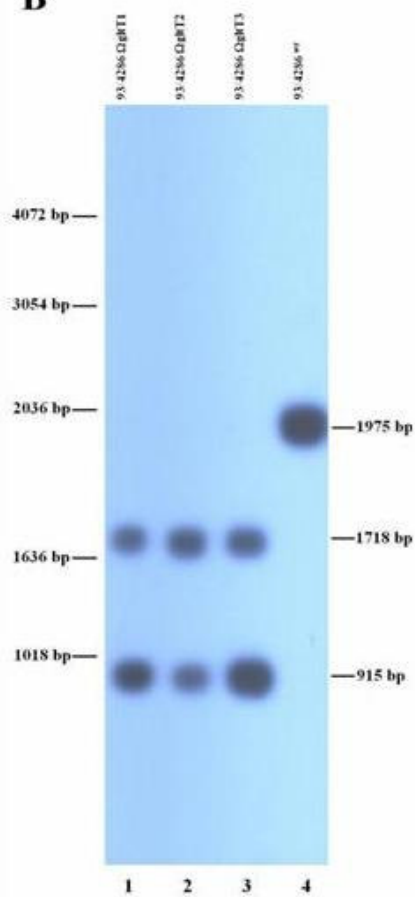


Figura 14. *Knock-out* del gene *gltT* nel ceppo 93/4286 mediante un singolo evento di *crossing-over*

A. Disegno sperimentale per la delezione del gene *gltT* mediante un singolo evento di *crossing-over*. In alto è indicata la mappa fisica e genetica della regione NMC1938-NMC1933 del ceppo 93/4286. In basso è indicata la mappa genetica del plasmide pDEΔ*gltT*; i determinanti genetici del vettore sono: i) *ermC*, gene per la resistenza all'eritromicina; ii) ΔNMC1937 (Δ*gltT*), un frammento BamHI di 482bp corrispondente alla regione centrale del gene *gltT*; iii) un frammento DUS, richiesto per un efficiente *uptake* del DNA durante la trasformazione. È anche indicata la localizzazione del frammento di DNA (barra) utilizzato come sonda nell'esperimento di Southern blot.

B. Esperimento di Southern blot che dimostra l'avvenuta inattivazione del gene *gltT*. Il DNA cromosomale è stato estratto dal ceppo parentale 93/4286 (corsia 4) e da tre cloni derivati, 93/4286Ω*gltT*1, 93/4286Ω*gltT*2 e 93/4286Ω*gltT*3 (corsie 1-3) ottenuti dalla trasformazione con il plasmide pDEΔ*gltT*. I DNA sono stati analizzati mediante Southern blot utilizzando la sonda *gltT*-specifica. Le barre sulla destra indicano i frammenti *gltT*-specifici le cui dimensioni sono state dedotte sulla base della migrazione relativa di una scala di pesi molecolari noti (barre sulla sinistra).

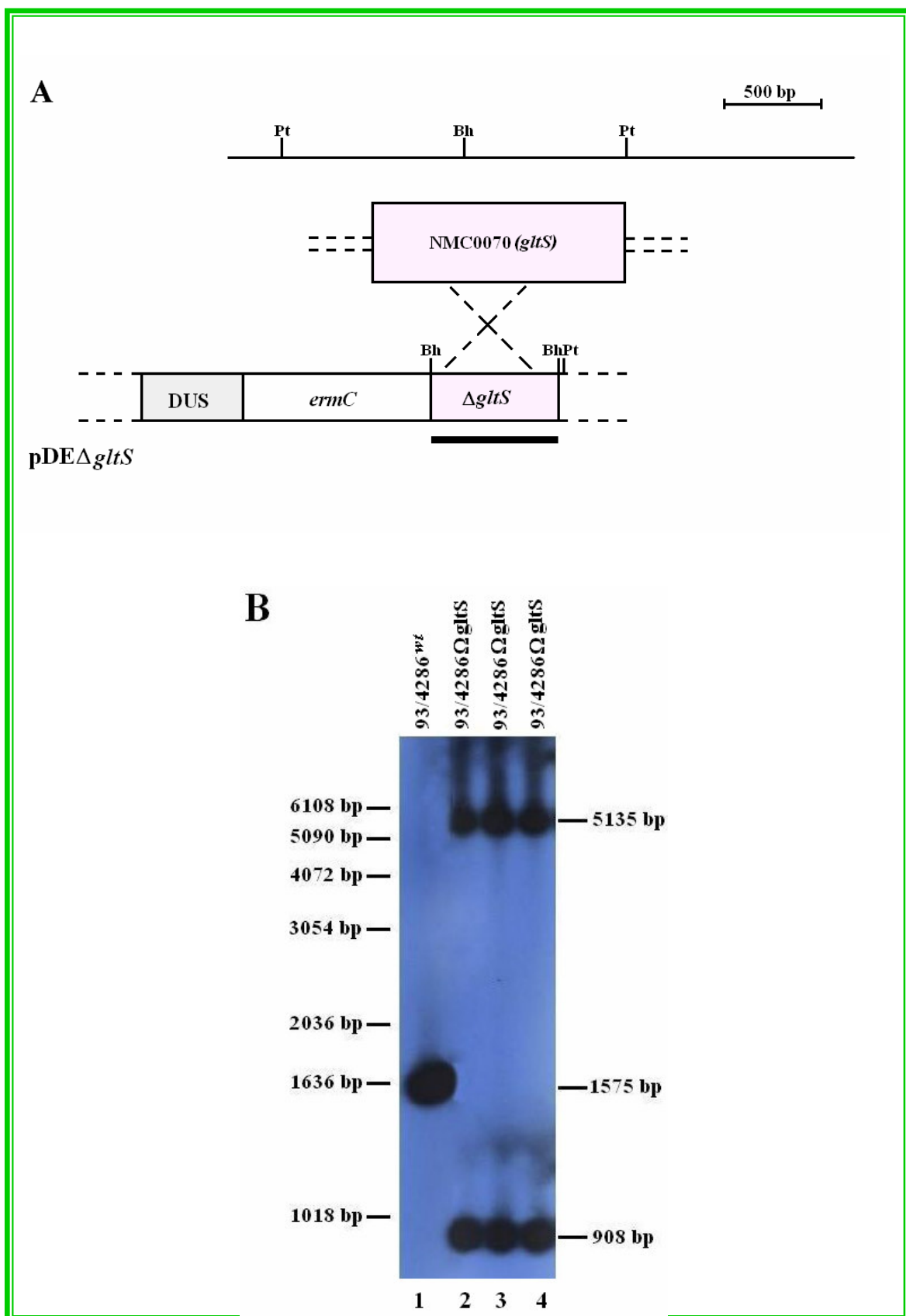


Figura 15. Knock-out del gene *gltS* nel ceppo 93/4286 mediante un singolo evento di *crossing-over*

A. Disegno sperimentale per la delezione del gene *gltS* mediante un singolo evento di *crossing-over*. In alto è indicata la mappa fisica e genetica della regione NMC0070 del ceppo 93/4286. In basso è indicata la mappa genetica del plasmide pDEΔ*gltS*; i determinanti genetici del vettore sono: i) *ermC*; ii) ΔNMC0070 (Δ*gltS*), un frammento BamHI di 546bp corrispondente alla regione centrale del gene *gltS*; iii) un frammento DUS. È anche indicata la localizzazione del frammento di DNA (barra) utilizzato come sonda nell'esperimento di Southern blot.

B. Esperimento di Southern blot che dimostra l'avvenuta inattivazione del gene *gltS*. Il DNA cromosomale è stato estratto dal ceppo parentale 93/4286 (corsia 1) e da tre cloni derivati, 93/4286Ω*gltS*1, 93/4286Ω*gltS*2 e 93/4286Ω*gltS*3 (corsie 2-4) ottenuti dalla trasformazione con il plasmide pDEΔ*gltS*. I DNA sono stati analizzati mediante Southern blot utilizzando la sonda *gltS*-specifiche. Le barre sulla destra indicano i frammenti *gltS*-specifici le cui dimensioni sono state dedotte sulla base della migrazione relativa di una scala di pesi molecolari noti (barre sulla sinistra).

Profilo di *survival* degli animali infettati con i ceppi isogenici

93/4286 Ω gltT e 93/4286 Ω gltS

Per testare i mutanti isogenici 93/4286 Ω gltT e 93/4286 Ω gltS così costruiti nell'ospite murino, è stato, in primo luogo, effettuato un saggio di *survival* dose-dipendente.

Per ciascun mutante isogenico, 2 gruppi di topi CD1 sono stati infettati con un titolo di batteri compreso tra 10^6 e 10^7 cfu/topo. La percentuale di animali sopravvissuti a ciascuna dose di infezione è stata analizzata con la curva di Kaplan-Meier.

Nessun animale infettato con il ceppo isogenico 93/4286 Ω gltT è deceduto dopo 10 giorni di osservazione, indipendentemente dalla dose infettiva utilizzata (100% *survival*).

Diversamente, dopo l'inoculo di un titolo di batteri di 10^6 cfu, due topi dei sei infettati con il ceppo isogenico 93/4286 Ω gltS sono morti nel corso dell'esperimento (66.6% *survival*).

Alla dose di 10^7 cfu, il 50% degli animali infettati è morto entro 48 ore dall'inoculo, con un 50% di *survival* (Fig. 16).

Il profilo di *survival* dei topi infettati indica, quindi, una attenuazione della virulenza del ceppo *gltT*-difettivo, ma non nel ceppo *gltS*-difettivo, il cui profilo di *survival* è del tutto paragonabile a quello del ceppo 93/4286^{wt}.

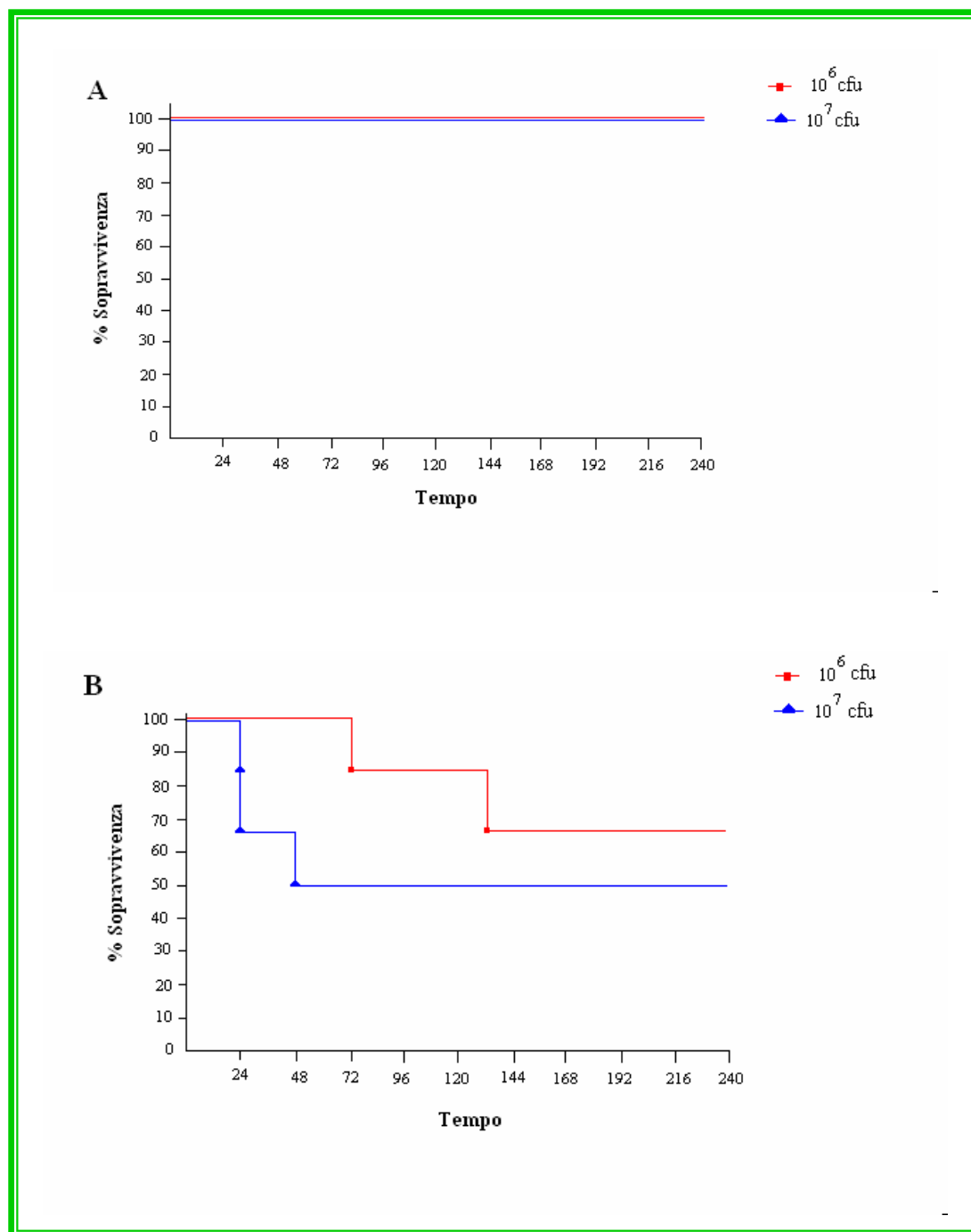


Figura 16. Curva di sopravvivenza Kaplan Meier di topi infettati con i mutanti isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS.

Due gruppi di topi sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con due diverse dosi dei mutanti isogenici 93/4286ΩgltT (A) e 93/4286ΩgltS (B). Gli animali sono stati monitorati per 10 giorni ed è stata registrata la sopravvivenza. I risultati sono espressi come percentuale di sopravvivenza in funzione del tempo.

Titoli batterici negli animali infettati con i ceppi isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS

Per stabilire il titolo di batteri nel sangue gli animali, infettati con un titolo di batteri di 10^7 cfu/topo sono stati sacrificati a diversi tempi d'infezione (6, 24, 48 ore) e sono stati prelevati il cervello, la milza e il fegato. Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca effettuata prima del sacrificio.

La conta batterica è stata calcolata come cfu/ml di sangue o cfu/organo in funzione del tempo post-infezione. Gli animali infettati con il ceppo isogenico 93/4286ΩgltT, dopo 24 ore dall'inoculo della dose infettante, hanno mostrato conte batteriche nel cervello di due ordini di grandezza più basse rispetto al ceppo 93/4286^{wt} ($5.8 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^4$ cfu/organo). Inoltre, le conte batteriche prossime allo zero nel sangue, nella milza e nel fegato, già dopo 24 ore dall'infezione, indicano che gli animali riescono rapidamente a risolvere l'infezione sistemica (Tabella 2).

Diversamente, le conte batteriche rilevate negli animali infettati con il ceppo isogenico 93/4286ΩgltS sono del tutto paragonabili a quelle rilevate negli animali infettati con il ceppo *wild-type* (dati non mostrati).

Ceppo 93/4286ΩgltT				
	CERVELLO	SANGUE	MILZA	FEGATO
6 ore	$3.3 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$	$5 \times 10^3 \pm 4.3 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3 \pm 8.7 \times 10^2$	$8 \times 10^2 \pm 4 \times 10^2$
24 ore	$5.8 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^4$	N.R.	N.R.	N.R.
48 ore	$1.07 \times 10^2 \pm 1.75 \times 10^2$	N.R.	N.R.	N.R.

Tabella 2. Conte batteriche del ceppo 93/4286ΩgltT nel sangue e in campioni di omogenato di cervello, milza e fegato, dopo 6, 24 e 48 ore dall'infezione.

N. R.= i valori non sono rilevabili perché al di sotto del *detection limit*.

Valutazione dei parametri clinici della meningite meningococcica degli animali infettati con il ceppo 93/4286^{wt} e con i ceppi isogenici

93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS

Per valutare i parametri di progressione della malattia gli animali infettati con un titolo batterico compreso tra 10^6 e 10^7 dei ceppi 93/4286^{wt}, 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS sono stati osservati tre volte al giorno, valutando la variazione di peso e temperatura corporei dopo l'infezione. Ciascun parametro è stato valutato in due esperimenti indipendenti effettuati su gruppi di 6 animali.

I dati ottenuti confermano l'iniziale calo di peso corporeo degli animali infettati con il ceppo 93/4286^{wt}. Diversamente, i topi infettati con il mutante isogenico 93/4286ΩgltT, dopo l'iniziale perdita di peso corporeo, acquistano nuovamente il peso iniziale (Fig. 17).

La variazione della temperatura corporea mostra un andamento paragonabile: in tutti gli animali dopo l'infezione è stato rilevato uno stato di ipotermia; tuttavia, negli animali infettati con il mutante isogenico 93/4286ΩgltT si assiste ad una discreta ripresa della temperatura (Fig. 18).

Al contrario, i dati preliminari ottenuti negli animali infettati con il mutante isogenico 93/4286ΩgltS sembrano indicare un comportamento sovrapponibile a quello osservato negli animali con il ceppo 93/4286^{wt} (dati non mostrati).

Va, inoltre, sottolineato che, all'esame obiettivo, solo gli animali infettati con i ceppi 93/4286^{wt} e con il mutante isogenico 93/4286ΩgltS, e non quelli infettati con il mutante isogenico 93/4286ΩgltT, hanno mostrato segni di infiammazione meningeale (rigonfiamento del pelo, fotofobia, letargia).

I parametri clinici valutati confermano, quindi, quanto già suggerito dagli studi di *survival* e dalle analisi microbiologiche, ossia una significativa attenuazione della virulenza del ceppo *gltT*-difettivo, ma non nel ceppo *gltS*-difettivo.

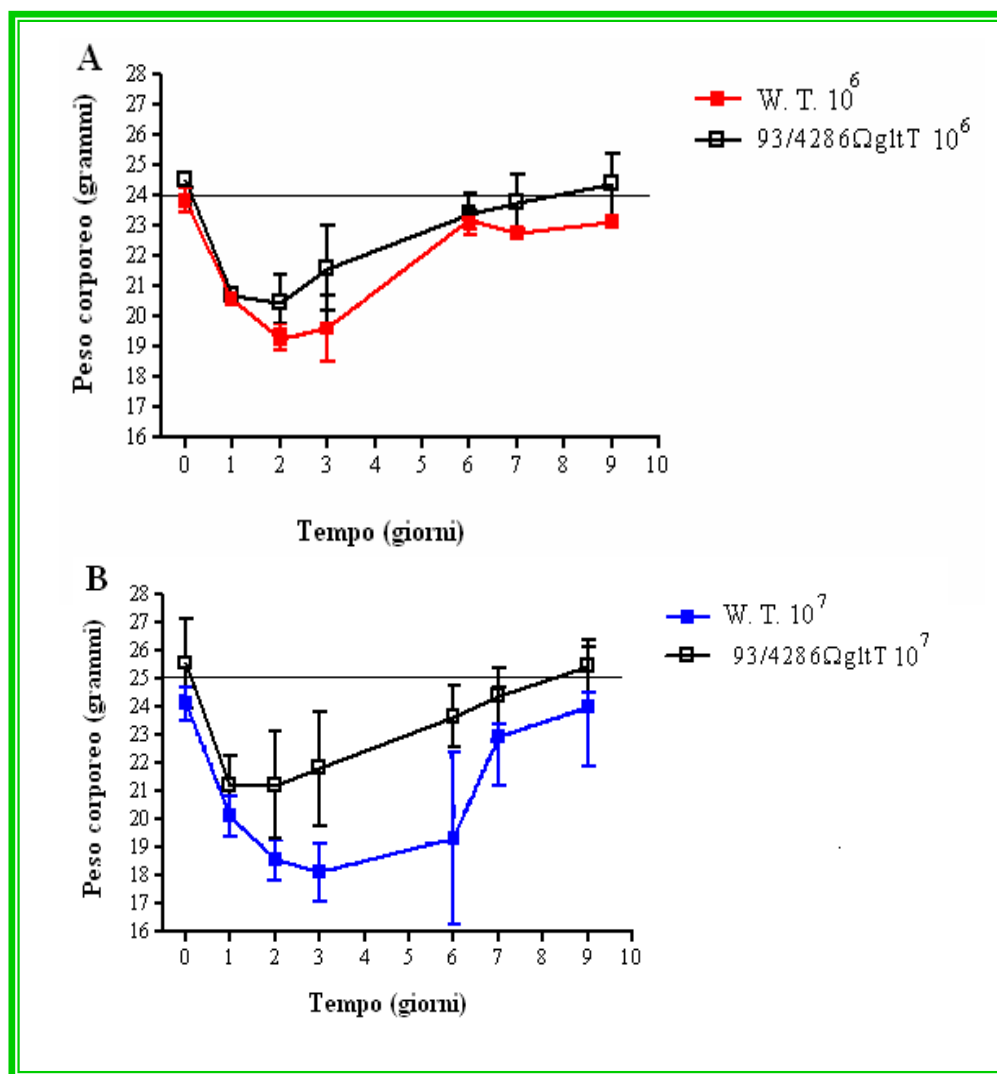


Figura 17. Valutazione del peso corporeo degli animali infettati con il ceppo 93/4286^{wt} e con il mutante isogenico 93/4286 Ω gltT

Due gruppi di topi sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con due diverse dosi dei ceppi di *N. meningitidis* 93/4286^{wt} e 93/4286 Ω gltT e sono stati monitorati tre volte al giorno per valutare la variazione di peso corporeo dopo l'infezione.

I grafici illustrano i valori del peso corporeo in funzione del tempo post-infezione.

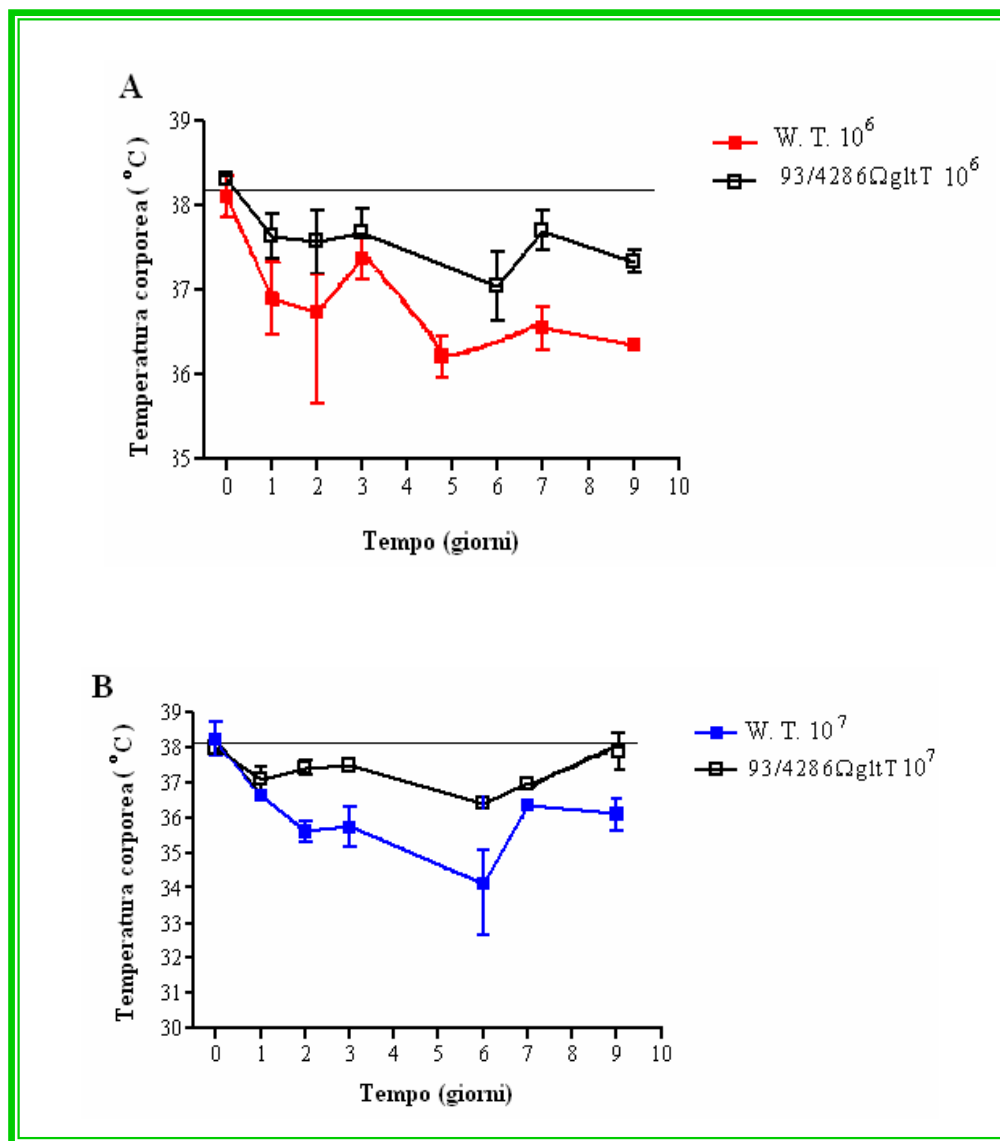


Figura 18. Valutazione della temperatura corporea in topi infettati con il ceppo 93/4286^{wt} e con il mutante isogenico 93/4286 Δ gltT

Due gruppi di topi sono stati infettati per via intracranica/subaracnoidea con due diverse dosi dei ceppi di *N. meningitidis* 93/4286^{wt} e 93/4286 Δ gltT e sono stati monitorati tre volte al giorno per valutare la variazione di temperatura corporea dopo l'infezione.

I grafici illustrano i valori della temperatura corporea in funzione del tempo post-infezione.

Analisi istopatologica degli animali infettati con il ceppo 93/4286^{wt} e con i ceppi isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS

Per confermare l'attenuazione della virulenza del ceppo *gltT*-difettivo è stata eseguita l'analisi istopatologica della milza e dell'encefalo degli animali infettati con un titolo batterico di 10⁶ e 10⁷ dei ceppi 93/4286^{wt}, 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS e sacrificati dopo l'infezione.

Diversamente da quanto osservato negli animali infettati con i ceppi 93/4286^{wt} e 93/4286ΩgltS, i topi infettati con il mutante isogenico 93/4286ΩgltT non mostrano alcun cambiamento morfologico significativo. Infatti, l'evidente infiltrato infiammatorio acuto di tipo granulocitario osservabile nel cervello degli animali infettati con il ceppo 93/4286^{wt} e con il ceppo isogenico 93/4286ΩgltS è, invece, molto lieve, o quasi del tutto assente, negli animali infettati con il mutante isogenico 93/4286ΩgltT.

A livello splenico, l'iperplasia della polpa bianca è rilevabile solo negli animali infettati con le dosi più elevate del ceppo selvatico e del mutante isogenico 93/4286ΩgltS (Tabella 3).

L'analisi istopatologica, quindi, conferma l'attenuazione della virulenza del ceppo 93/4286ΩgltT, e sottolinea, in particolare, l'incapacità di tale ceppo a moltiplicarsi nel liquor, e quindi, a indurre infiammazione meningeale.

Campione Clinico	Dose di infezione	Infiltrato granulocitario meningeo	Infiltrato granulocitario intraparenchimale	Infiltrato granulocitario ventricolare	Iperplasia reattiva splenica
Controllo	50µl GC	-	-	-	-
93/4286 ^{wt}	10 ⁷ cfu	+++	++	+++	+
93/4286 ^{wt}	10 ⁶ cfu	++	+	+++	-
93/4286ΩgltT	10 ⁷ cfu	+	-	-	-
93/4286ΩgltT	10 ⁶ cfu	+	-	-	-
93/4286ΩgltS	10 ⁷ cfu	+++	+	+++	+
93/4286ΩgltS	10 ⁶ cfu	++	-	++	-

Tabella 3. Analisi istopatologica della milza e dell'encefalo di topi infettati con il ceppo 93/4286^{wt} ed i mutanti isogenici 93/4286ΩgltT, 93/4286ΩgltS

La tabella riporta una valutazione semiquantitativa del processo flogistico di campioni istopatologici di milza ed encefalo di topi infettati con due diverse dosi del ceppo 93/4286^{wt} e dei mutanti isogenici 93/4286ΩgltT e 93/4286ΩgltS. Il controllo è stato effettuato inoculando terreno liquido GC (*GonoCoccal medium*).

i) +++, infiltrato infiammatorio evidente; ii) ++, infiltrato infiammatorio moderato; iii) +, infiltrato infiammatorio lieve; iv) -, infiltrato infiammatorio assente.

Saggio di coinfezione con il ceppo 93/4286^{wt} ed il mutante isogenico

93/4286 Ω gltT e valutazione dell'indice di competizione

I risultati ottenuti indicano chiaramente che il trasportatore GltT per l'L-glutammato contribuisce significativamente alla virulenza del meningococco. Per confermare l'importanza del trasportatore GltT per l'L-glutammato nella patogenicità di *N. meningitidis* è stato valutato l'indice di competizione (CI) infettando gli animali, in gruppi di nove, con il ceppo 93/4286^{wt} e con il derivato isogenico 93/4286 Ω gltT eritromicina-resistente, miscelati in un rapporto di 1:1.

Gli animali sono stati sacrificati dopo 6, 24 e 48 ore dall'infezione. Le conte batteriche sono state valutate nel sangue e in omogenati di cervello, milza e fegato piastrando in parallelo diluizioni seriali su agar GC e su agar GC selettivo addizionato con eritromicina 7 μ g ml⁻¹ per distinguere tra i ceppi, come dettagliatamente descritto in Materiali e Metodi.

L'indice di competizione è stato calcolato dal rapporto tra il ceppo isogenico e il ceppo *wild-type* nella sospensione batterica *output* rispetto al rapporto tra i due ceppi nella sospensione batterica *input*.

I valori del CI ottenuti sono sempre minori di 1, il che indica chiaramente la minore *fitness* del ceppo isogenico 93/4286 Ω gltT rispetto al ceppo 93/4286^{wt}, sia nell'infezione sistemica che in quella localizzata nel sito di infezione (Fig. 19)

Diversamente, i due ceppi hanno, *in vitro*, una *fitness* del tutto paragonabile (dati non mostrati).

In particolare, i valori ottenuti nel cervello indicano che la *fitness* del ceppo isogenico è inferiore rispetto a quella del ceppo *wild-type* di 2.3 volte a 6 ore, 16,7 volte a 24 ore e 40 volte a 48 ore.

I valori del CI molto bassi alle 24 ore in tutti gli organi (sangue: 0.0005; milza: 0.008; fegato: 0.0006) dipendono dal fatto che non sono stati recuperati batteri mutanti in tali

organi: per poter calcolare il CI si assume, in tal caso, che almeno una colonia sia stata recuperata da questi organi (Darwin e Miller, 1999)

Non è stato possibile calcolare i valori del CI a 48 ore dall'infezione in sangue, milza e fegato poichè i batteri sono stati eliminati da tali organi.

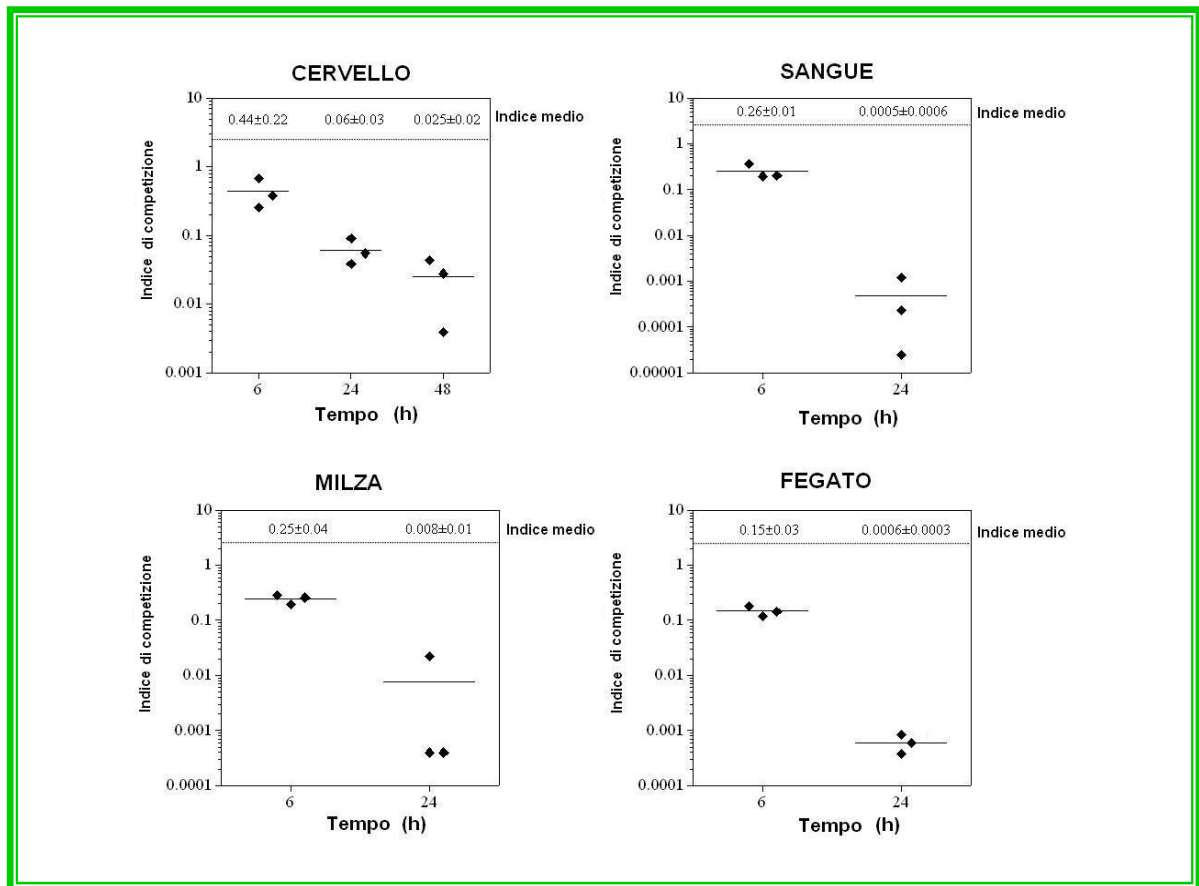


Figura 19. Indici di competizione dei ceppi 93/4286^{wt} e 93/4286Ω^{gltT} in sangue, cervello, milza e fegato

Gruppi di nove animali sono stati infettati per via intracranica/suoracnoidea con un rapporto 1:1 dei ceppi 93/4286^{wt} e 93/4286Ω^{gltT}. Gli indici di competizione sono stati calcolati nel sangue e in omogenati di cervello, milza e fegato dopo 6, 24 e 48 ore dall'infezione.

Le linee orizzontali indicano la mediana. I valori ottenuti sono sempre inferiori a 1, il che indica che il ceppo isogenico ha, *in vivo*, una *fitness* sempre inferiore rispetto al ceppo *wild-type*.

DISCUSSIONE

L'infezione batterica del cervello è una condizione clinica rara, poiché il rapporto tra il tessuto nervoso e il sangue è completamente diverso da quello di ogni altro organo. Per un cospicuo numero di sostanze vi è, infatti, una barriera alla diffusione dai capillari sanguiferi verso i neuroni: questa barriera viene detta, appunto, barriera emato-encefalica, ed è costituita dall'endotelio capillare e dalla sua membrana basale.

I capillari del tessuto nervoso presentano un endotelio continuo, le cui cellule sono collegate da giunzioni strette (*tight junctions*). È ormai assodato che questo tipo di giunzione è di cruciale importanza nel determinare le condizioni di limitata permeabilità, realizzando una barriera funzionale, capace di ostacolare, per esempio, il passaggio di farmaci o di batteri.

Ebbene, alcune specie batteriche hanno sviluppato strategie per oltrepassare la barriera emato-encefalica ed entrare nello spazio subaracnoideo, raggiungendo le meningi.

Sebbene l'infezione meningococcica sistemica sia principalmente una malattia batteriemia, *N. meningitidis* dimostra un marcato tropismo per le meningi. I meningococchi aderiscono prontamente all'endotelio cerebrovascolare e, anche se in virtù di meccanismi ancora non ben definiti, penetrano attraverso la parete dei vasi sanguigni. Successivamente la permeabilità della barriera emato-encefalica viene ulteriormente incrementata da mediatori infiammatori prodotti localmente come TNF α , IL-1 e IL-6, indotti dagli aumentati livelli di LPS nel liquor. Nei pazienti con meningite meningococcica, i livelli di LPS nel liquor sono, infatti, da 100 a 1000 volte più elevati di quelli rilevati in campioni di plasma prelevati contemporaneamente. *N. meningitidis* riesce, così, a raggiungere lo spazio subaracnoideo e, quindi, le meningi.

Sebbene negli ultimi anni siano stati sviluppati diversi modelli animali volti allo studio della patogenesi della meningite meningococcica, nessuno è stato in grado di mimare in modo adeguato la sequenza degli eventi così come descritti nel suo ospite naturale. I

modelli esistenti si basano, infatti, sul tentativo di causare meningite a seguito di colonizzazione del nasofaringe (dopo inoculo intranasale) (Mackinnon *et al.*, 1992; Salit e Tomalty, 1984; Salit *et al.*, 1984) o di setticemia (dopo inoculo intraperitoneale) (Saukkonen, 1988; Toropainen *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000): tutti questi modelli sono gravati dallo svantaggio che la meningite viene indotta in una ridotta percentuale di animali e la maggior parte muore per sepsi senza sviluppare meningite.

Una strategia alternativa per lo studio della meningite batterica potrebbe essere l'induzione diretta della malattia attraverso l'introduzione dei batteri virulenti per via intracerebrale/subaracnoidea. Recentemente, infatti, è stato sviluppato un modello di meningite pneumococcica basato sull'inoculazione dei batteri nel cervello del topo attraverso il bregma (*intracerebral-bregma route*) (Chiavolini *et al.*, 2004).

A partire, quindi, dal sistema sperimentale usato per studiare la meningite causata da *S. pneumoniae*, nel presente lavoro, abbiamo sviluppato un modello di meningite meningococcica in *outbred mice* basato sull'inoculo diretto dei batteri nello spazio subaracnoideo dei topi.

Le meningi che circondano lo spazio subaracnoideo consistono nell'aracnoide e nella pia madre che insieme costituiscono la leptomeninge. La pia madre encefalica è la più interna delle meningi ed aderisce strettamente a tutta la superficie dell'encefalo. La leptomeninge, ponendosi tra i vasi e il materiale nervoso entra, inoltre, nella costituzione della barriera emato-encefalica.

Introdurre i meningococchi direttamente nello spazio subaracnoideo dei topi, quindi, non solo consente di superare l'ostacolo rappresentato dalle fasi di colonizzazione e di invasione mucosale uomo-specifiche, ma permette, altresì, di superare direttamente la barriera emato-encefalica, ed indurre, conseguentemente, infiammazione meningea.

Gli animali sono stati inoculati per via intracranica/subaracnoidea attraverso un punto molle della scatola cranica localizzato a 3.5mm dal bregma. Questo sito di inoculo

permette ai batteri di raggiungere lo spazio subaracnoideo attraversando i lobi frontali. La tecnica di inoculo non è traumatica per gli animali: la lobotomia frontale è, infatti, tollerata sia negli uomini (Pillon *et al.*, 1999) che nei ratti (Karganov *et al.*, 1998), essendo i lobi frontali principalmente coinvolti in funzioni comportamentali e cognitive.

È noto come tra le necessità metaboliche di *N. meningitidis* ci sia una fonte di ferro; è altrettanto noto in letteratura che la somministrazione di ferro agli animali da esperimento prima dell'infezione aggrava alcune malattie batteriche (Holbein, 1980, Holbein *et al.*, 1979). Alla luce di questo, due ore prima dell'infezione ciascun animale ha ricevuto un'iniezione intraperitoneale di destrano ferrico (250mg kg^{-1}). Per l'infezione i batteri sono stati risospesi in un volume totale di $50\mu\text{l}$ di terreno liquido GC contenente $100\mu\text{g}$ di destrano ferrico e poi inoculati negli animali per via intracranica/subaracnoidea.

La via di inoculo intracranica/subaracnoidea è stata testata utilizzando un ampio range di titoli batterici di due diversi ceppi di *N. meningitidis* di sierogruppo C, per i quali è disponibile un vaccino efficace. L'uso di titoli batterici diversi ha permesso di valutare accuratamente la virulenza di ciascun ceppo e di stabilire, inoltre, la dose batterica più appropriata da impiegare negli studi successivi.

La prima serie di esperimenti ha avuto lo scopo di determinare la dose in grado di uccidere il 50% degli animali (LD_{50}). Il profilo di *survival* dei topi infettati con i ceppi 93/4286 e CF5C, sierogruppo C, è del tutto paragonabile, con una LD_{50} di 1.8×10^7 e 2.1×10^7 rispettivamente.

Per caratterizzare in dettaglio la meningite meningococcica indotta dall'inoculo intracranico/subaracnoideo, è stato, pertanto, utilizzato il ceppo 93/4286, linea ipervirulenta ET-37, ben caratterizzato genotipicamente e fenotipicamente.

Il profilo di *survival* degli animali infettati con diverse dosi del ceppo 93/4286 ha dimostrato che la dose di 10^7 cfu è letale per il 50% degli animali entro 48 ore dall'infezione. Tuttavia, gli animali moribondi con meningite acuta dopo l'iniezione di una

dose di 10^7 cfu non sono setticemici, dato che i meningococchi non si ritrovano nel sangue e negli organi periferici. Ciò nonostante, la valutazione dei parametri clinici indica uno stato di sofferenza generalizzata degli animali che perdono peso e vanno incontro ad uno stato di ipotermia; del resto, all'esame obiettivo gli animali hanno sviluppato rapidamente segni di infiammazione meningea (rigonfiamento del pelo, letargia, fotofobia). In particolare, gli animali infettati con le dosi batteriche più elevate sono andati incontro ad uno stato di intenso torpore con quasi totale obnubilamento del sensorio; tale condizione è stata rapidamente seguita dalla morte dell'animale.

Parallelamente, *N. meningitidis* causa caratteristicamente nell'uomo una malattia acuta infettiva e più del 90% dei pazienti che si ammalano presenta la meningococcemia e/o la meningite. Le manifestazioni cliniche della meningococcemia variano da sintomi minori di batteriemia transitoria fino alla malattia fulminante della durata di poche ore. L'esordio è, di solito, improvviso, con febbre, brividi, nausea, vomito, eruzione cutanea, mialgie e artralgie. La febbre è praticamente universale, anche se alcuni pazienti con malattia fulminante possono essere afebrili o anche ipotermici. La meningococcemia fulminante, precedentemente chiamata sindrome di Waterhouse-Friderichsen, si distingue dalle forme più lievi per la rapida progressione e l'estrema aggressività ed è caratterizzata dallo sviluppo di shock, coagulazione intravascolare disseminata e insufficienza multiorganica. L'esordio è rapido; in alcune ore si sviluppano le lesioni purpuriche, l'ipotensione e la vasocostrizione periferica con estremità fredde e cianotiche. La meningite è frequentemente associata con la meningococcemia; la maggior parte dei pazienti in cui si manifesta meningite sviluppa rapidamente i segni di infiammazione meningea, che comprendono grave cefalea, confusione, letargia e vomito. Con la progressione della malattia, la letargia può trasformarsi in coma e possono apparire convulsioni, paralisi dei nervi cranici ed emiparesi o altri segni neurologici focali.

Per avere un quadro patologico completo è stata eseguita l'analisi istopatologica del tessuto cerebrale degli animali moribondi. Tale analisi ha rivelato la presenza di infiammazione meningeale, con un esteso accumulo di neutrofili nello spazio leptomeningeale e ventricolare. Nessun segno infiammatorio è stato osservato a seguito di iniezione di terreno liquido GC negli animali di controllo.

Non è mai stata osservata la presenza di ascesso cerebrale, il che conferma che l'inoculo intracranico/subaracnoideo è un modello di meningite e non di encefalite.

La distribuzione dell'infiltrato infiammatorio nel cervello degli animali moribondi mima l'istopatologia della meningite nell'uomo. L'esame post-mortem del cervello di pazienti deceduti rapidamente (meno di 24 ore) a seguito di meningite acuta piogena rivela, infatti, la presenza di lesioni moderate consistenti in un essudato leptomeningeale sparso con congestione dei vasi venosi; l'infiammazione può estendersi nei ventricoli, causando una ventricolite. I pazienti che invece sopravvivono per più di due giorni mostrano spesso una severa infiammazione con fibrosi leptomeningeale (Greenfield *et al.*, 2002).

Le analisi istopatologiche, gli studi di *survival*, i parametri clinici e microbiologici dimostrano, quindi, che l'inoculo intracranico/subaracnoideo è una tecnica efficace e riproducibile che assicura l'instaurarsi di meningite meningococcica. Questo modello sperimentale può essere particolarmente utile per lo studio delle interazioni ospite-parassita a livello cerebrale, laddove si voglia mettere l'accento sia sui fattori di virulenza del patogeno, che sui meccanismi di difesa cerebrali dell'ospite.

Nel sistema di infezione in *outbred mice* abbiamo, pertanto, analizzato nuovi determinanti di virulenza del meningococco coinvolti nel processo di invasione della cellula eucariotica e indotti trascrizionalmente nell'ambiente intracellulare in un modello di infezione *in vitro*, basato sull'utilizzo di linee cellulari di derivazione epiteliale HeLa. In particolare, geni coinvolti nel metabolismo e nell'*uptake* dell'L-glutammato (Monaco *et al.*, 2006)

Va, infatti, sottolineato che gli studi condotti al fine di comprendere la fisiologia e la biochimica di *N. meningitidis* non sono numerosi e la maggior parte di essi risale ad una trentina di anni fa, nonostante il batterio in questione sia responsabile di una considerevole morbilità e mortalità nei Paesi sviluppati e, soprattutto, nei Paesi in via di sviluppo (Jones, 1995). Poche sono, quindi, le conoscenze circa le probabili interazioni tra i processi metabolici ed i meccanismi patogenetici che possono determinare l'innesco ed il perdurare dell'infezione meningococcica, in cui un fattore di cruciale rilevanza è indubbiamente la capacità del batterio di captare e sintetizzare nutrienti essenziali per la sua sopravvivenza nei differenti microambienti (intracellulari ed extracellulari) in cui si viene a trovare all'interno dell'ospite umano nel corso del processo infettivo.

I mutanti isogenici dei due sistemi di trasporto per l'L-glutammato, GltT e GltS, generati per inattivazione inserzionale nel ceppo 93/4286 sono, quindi, stati testati nell'ospite murino valutando gli stessi parametri utilizzati per la caratterizzazione della meningite meningococcica indotta dal ceppo 93/4286^{wt}, al fine di rendere agevole la comparazione della virulenza ed analizzare, quindi, il ruolo patogenetico dell'operon GltT.

Ebbene, mentre il comportamento del ceppo isogenico 93/4286 Ω gltS è del tutto sovrapponibile a quello del ceppo 93/4286^{wt}, particolarmente interessanti sono i risultati ottenuti con il ceppo isogenico 93/4286 Ω gltT: tutti i parametri valutati indicano, infatti, un'attenuazione della virulenza nel ceppo *gltT*-difettivo. In particolare, nel saggio di *survival* nessun animale infettato con il ceppo isogenico 93/4286 Ω gltT è deceduto dopo 10 giorni di osservazione, indipendentemente dalla dose infettiva utilizzata. L'analisi clinica ed istologica ha indicato che questi animali non sviluppano meningite.

Particolarmente significativo è il risultato della conta batterica: gli animali infettati con il ceppo isogenico 93/4286 Ω gltT, dopo 24 ore dall'inoculo della dose infettante, hanno mostrato conte batteriche nel cervello di due ordini di grandezza più basse rispetto al ceppo 93/4286^{wt}: a differenza del ceppo parentale, il mutante isogenico 93/4286 Ω gltT non è

capace di moltiplicarsi nel liquor e, quindi, di indurre infiammazione meningeale, come, per altro, sottolineato dall'analisi istopatologica del cervello degli animali infettati con il ceppo 93/4286 Ω gltT. Questo risultato è in accordo con la minore *fitness* di tale ceppo nell'ambiente intracellulare (Monaco *et al.*, 2006).

Per confermare l'importanza del trasportatore GltT per l'L-glutammato nella patogenicità di *N. meningitidis* è stato valutato l'indice di competizione (CI) infettando gli animali con il ceppo 93/4286^{wt} e con il derivato isogenico 93/4286 Ω gltT, miscelati in un rapporto di 1:1.

Storicamente la valutazione, *in vivo*, del contributo di un singolo gene alla virulenza batterica viene effettuata utilizzando il test dell'LD₅₀. Tale test, sebbene rappresenti una valida misura della virulenza, presenta, tuttavia, delle limitazioni in quanto riflette solo gli effetti cumulativi di tutti i passaggi coinvolti nel determinare letalità. Il fatto che una mutazione non determini un aumento della LD₅₀ non significa necessariamente che quella mutazione non riguardi un importante determinante di virulenza, ma potrebbe riflettere semplicemente una situazione nella quale gli effetti di quella mutazione non sono sufficienti per essere individuati dal suddetto test.

L'indice di competizione è una misura alternativa che, avvalendosi di un saggio di infezione mista, determina il grado di attenuazione della virulenza causato da una mutazione.

Un uguale numero dei due ceppi (il *wild-type* e il mutante) vengono combinati (*input*) ed usati per infettare l'ospite animale. Dopo un adeguato periodo di tempo si effettuano le conte batteriche dagli organi target, distinguendo i ceppi in base all'antibiotico resistenza del mutante (*output*). L'indice di competizione è definito come il rapporto tra i ceppi mutanti e *wild-type* nella sospensione batterica *output* rispetto al rapporto tra i due ceppi nella sospensione batterica *input*.

L'indice di competizione è una misura dell'attenuazione della virulenza più sensibile rispetto all' LD_{50} perché indica direttamente il numero di batteri, piuttosto che la sopravvivenza dell'ospite animale. Del resto, il fatto che la LD_{50} sia calcolata dal numero di animali che sopravvivono all'infezione, mentre l'indice di competizione sia ottenuto dal numero di batteri prima e dopo l'infezione significa che quest'ultima misura si basa su un numero di campioni decisamente maggiore. L'indice di competizione costituisce, quindi, una misura dell'attenuazione della virulenza più accurata rispetto all' LD_{50} in particolare quando si ha a disposizione un numero di animali relativamente piccolo. Inoltre, testando il grado di virulenza del ceppo mutante rispetto al ceppo *wild-type* nello stesso ospite animale, si eliminano eventuali variazioni tra animale ed animale.

Ebbene, i valori del CI ottenuti sono sempre minori di 1, il che indica chiaramente la minore *fitness* del ceppo isogenico 93/4286 Ω gltT rispetto al ceppo 93/4286^{wt}, sia nell'infezione sistemica che in quella localizzata nel sito di infezione. Diversamente, i due ceppi hanno, *in vitro*, una *fitness* del tutto paragonabile.

Il comportamento dei mutanti isogenici per il gene *gltT*, codificante la permeasi del trasportatore ABC per l'L-glutammato, attivo nell'ambiente intracellulare evidenzia, quindi, una stretta relazione tra metabolismo intermedio e patogenicità meningococcica. L'attenuata virulenza del ceppo *gltT*-difettivo rispetto al ceppo selvatico attribuisce, inoltre, al glutammato un ruolo fondamentale per la colonizzazione e la sopravvivenza nel sito d'infezione.

All'interno della cellula, il meningococco, infatti, non ha accesso al glucosio poiché questo viene rapidamente fosforilato dalla cellula a glucosio-6-fosfato, un substrato che, come gli altri intermedi della via glicolitica, non può essere assimilato dai meningococchi. Le migliori fonti intracellulari di carbonio sono il piruvato, il lattato ed alcuni aminoacidi, come l'L-glutammato, che stimola il catabolismo del citrato (Hill, 1971). In condizioni fisiologiche la concentrazione extracellulare di questo aminoacido va da 30 a 90 μ M nel

plasma, sebbene dipenda dell'alimentazione, dall'esercizio fisico e dai ritmi circadiani (Fernstrom *et al.*, 1979; Tsai *et al.*, 1999). La concentrazione intracellulare può, invece, essere considerevolmente più alta, ma dipende dal tipo e dal metabolismo cellulare (Kovacevic e McGivan, 1983; Tsai *et al.*, 1999). In realtà il metabolismo dell'L-glutammato è strettamente legato a quello della L-glutamina, il più abbondante aminoacido nel plasma (Fernstrom *et al.*, 1979). L'L-glutammato può essere prodotto dalla L-glutamina dall'enzima γ -glutamyltransferasi, nell'ambiente extracellulare, e dall'enzima glutaminasi nell'ambiente intracellulare.

L'ambiente intracellulare è caratterizzato da una concentrazione di sodio bassa (tra 15 e 20mM); diversamente, la concentrazione di sodio è molto alta nell'ambiente extracellulare e nel plasma (tra 130 e 150mM). Nell'ambiente intracellulare, a bassa concentrazione di sodio, ma ad alta concentrazione di L-glutammato, diventa, così, indispensabile l'attività del trasportatore GltT, sodio-indipendente, al fine di supportare l'attività del ciclo degli acidi tricarbossilici. Il ruolo centrale del glutammato nel metabolismo del meningococco nell'ambiente intracellulare è, inoltre, confermato dal fatto che GdhR è responsabile della regolazione coordinata dell'*uptake* del glutammato attraverso l'operon GltT e dell'ossidazione del glutammato attraverso l'enzima NADP-GDH (Monaco *et al.*, 2006).

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare:

Carmelo Bruno Bruni, coordinatore del corso di Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare, per il sostegno, la disponibilità ed il supporto scientifico che mi ha dato durante tutto il periodo trascorso nei suoi laboratori, un ambiente stimolante sia dal punto di vista professionale che umano;

Paola Salvatore, mio tutor durante gli anni di dottorato, per avermi seguito, consigliato e indirizzato durante il mio lavoro con costante professionalità e disponibilità, per l'affetto, la stima e la fiducia che ha sempre riposto in me e per i suoi preziosi insegnamenti;

Pietro Alifano, per l'aiuto ed i consigli "illuminanti" che sono risultati fondamentali per il perseguire dei miei risultati scientifici;

Maria Stella Carlomagno per gli efficaci consigli, le utili informazioni e gli interessanti spunti critici che ha saputo darmi;

Roberta Colicchio, mia collega ed amica, per avermi sempre accompagnato e consigliato nel mio percorso scientifico, per avermi supportato nei miei momenti di abbattimento, per la preziosa collaborazione che ha consentito lo sviluppo di questo lavoro e per le lunghe chiacchierate che hanno reso più piacevoli questi anni. Non la ringrazierò mai abbastanza...

Caterina Pagliarulo per la sua preziosa collaborazione e presenza e per avermi mostrato sempre stima ed affetto;

Chiara Pagliuca, Anna Sparano, Raffaele Castello e tutte le persone dei laboratori del Prof. Bruni per il supporto morale e scientifico e per l'amicizia mostrata nella mia esperienza presso il Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano";

Peppe e Lia, la mia mamma e il mio papà, per la pazienza e l'incoraggiamento datomi in ogni momento di scoramento e difficoltà; difficilmente avrei potuto portare a termine un lavoro di così grande impegno senza i loro contributi materiali ed affettivi;

Michele e Costantino, i miei fratelli, per il prezioso supporto tecnico-pratico.

BIBLIOGRAFIA

- Achtman, M.** (1995) Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. Trends Microbiol. **3**: 186-192.
- Alexander, H.L., Richardson, A.R., Stojiljkovic, I.** (2004) Natural transformation and phase variation modulation in *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol. **3**: 771-783.
- Aravind L, Wolf, Y.I., Koonin, E.V.** (2000) The ATP-cone: an evolutionarily mobile, ATP-binding regulatory domain. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **2**: 191-4.
- Archibald, F.S., Duong, M.N.** (1986) Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. Infect. Immun. **51**: 631-641.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G.** (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 4155-4160.
- Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Fairman, W.A., Wu, Y.N., Murdoch, G.H., North, R.A., Amara, S.G.** (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. J. Biol. Chem. **268**: 15329-15332.
- Ayala, P., Lin, L., Hopper, S., Fukuda, M., So, M.** (1998) Infection of epithelial cells by pathogenic *Neisseriae* reduces the levels of multiple lysosomal constituents. Infect Immun. **66**: 5501-5507.
- Ayala, P., Vasquez, B., Clary, S., Tainer, J.A., Rodland, K., So, M.** (2001) The pilus-induced Ca^{2+} flux triggers lysosome exocytosis and increases the amount of Lamp1 accessible to *Neisseria* IgA1 protease. Cellular Microbiology **3**: 265-275.
- Ayala, P., Vasquez, B., Wetzler, L., So, M.** (2002) *Neisseria gonorrhoeae* porin P1. B induces exocytosis and a redistribution of Lamp1 to the plasma membrane. Infect. Immun. **70**: 5965-5971.
- Belland, R.J., Chen, T., Swanson, J., Fischer, S.H.** (1992) Human neutrophil response to recombinant neisserial Opa protein. Mol. Microbiol. **6**: 1729-1737.
- Bhat, K.S., Gibbss, C.P., Barrera, O., Morrison, S.G., Jahnig, F., Stern, A., Kupsch, E.M., Meyer, T.F., Swanson, J.** (1991) The repertoire of opacity proteins displayed by *Neisseria gonorrhoeae* MS11 outer surface are encoded by a family of 11 complete genes. Mol. Microbiol. **5**: 1889-1901. *Corrigendum* (1992) **6**: 1073-1076.
- Bormann, E.R., Eikmanns, B.J., Sahm, H.** (1992) Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. Mol. Microbiol. **6**: 317-326.

- Branaham, S.E., Lillie, R.D.** (1932) Notes on experimental meningitidis in rabbits. Public Health Rep. **47**: 2137-2150.
- Branaham, S.E., Lillie R.D., Pabst, A.M.** (1937) Experimental meningitis in guinea pigs. Public Health Rep. **52**: 1135-1142.
- Brandtzaeg, P., Bjerre, A., Øvstebø, R., Brusletto, B., Joø, G.B., Kierulf, P.** (2001) *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. J. Endotoxin Res. **6**: 401-20.
- Britigan, B.E., Klapper, D., Svendsen, T., Cohen, M.S.** (1988) Phagocyte-derived lactate stimulates oxygen consumption by *Neisseria gonorrhoeae*. An unrecognized aspect of the oxygen metabolism of phagocytosis. J. Clin. Invest. **81**: 318-324.
- Broome, C.** (1986) The carrier state: *Neisseria meningitidis*. J. Antimicrob. Chemother. **18**: 25-34.
- Bucci, C., Lavatola, A., Salvatore, P., Del Giudice, L., Massardo, D.R., Bruni, C.B., Alifano, P.** (1999) Hypermutation in pathogenic bacteria: frequent phase variation in meningococci is a phenotypic trait of a specialized mutator biotype. Mol. Cell. **3**: 435-445.
- Buddingh, G.J., Polk, A.D.** (1939) The pathogenesis of meningococcus meningitis in the chick embryo. J. Exp. Med. **70**: 499-512.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., Guilhot, C.** (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. Molecular Microbiology **34**: 257- 267.
- Caugant, D.A.** (1998) Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. APMIS **106**: 505-525.
- Caugant, D.A., Froholm, L.O., Brove, K., Holten, E., Frasch, C.E., Mocca, L.F., Zollinger, W.D., and Selander, R.K.** (1986) Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci USA **83**: 4927-4931.
- Caugant, D.A., Kristiansen, B.E., Froholm, L.O., Bovre, K., Selander, R.K.** (1988) Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. Infec and Immun. **56**: 2060-2068.
- Caugant, D.A., Tzanakaki, G., Kriz, P.** (2007) Lessons from meningococcal carriage studies. FEMS Microbiol. Rev. **1**: 52-63.

- Chiang, S.L., Mekalanos, J.J.** (1998) Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization.
Mol. Microbiol. **27**: 797-805.
- Chiavolini D, Tripodi S, Parigi R, Oggioni MR, Blasi E, Cintonino M, Pozzi G, Ricci S.** (2004) Method for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice.
BMC Microbiol. **1**: 36.
- Cohen, M.S., Cooney, M.H.** (1984) A bacterial respiratory burst: stimulation of the metabolism of *Neisseria gonorrhoeae* by human serum.
J. Infect. Dis. **150**: 49- 56.
- Colicchio, R., Pagliarulo, C., Lamberti, F., Vigliotta, G., Bruni, C.B., Alifano, P., Salvatore, P.** (2006) RecB-dependent mutator phenotype in *Neisseria meningitidis* strains naturally defective in mismatch repair.
DNA repair. **5**: 1428-1438.
- Darwin, A.J., Miller, V.L.** (1999) Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis.
Mol. Microbiol. **1**: 51-62
- Deghmane, A.E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J.M., Taha, M.K.** (2002) Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein.
Mol. Microbiol. **6**: 1555-64.
- Deghmane, A.E., Giorgini, D., Maigre, L., Taha, M.K.** (2004) Analysis in vitro and in vivo of the transcriptional regulator CrgA of *Neisseria meningitidis* upon contact with target cells.
Mol. Microbiol. **3**: 917-27.
- Deguchi, Y., Yamato, I., Anraku, Y.** (1990) Nucleotide sequence of *gltS*, the Na⁺/glutamate symport carrier gene of *Escherichia coli* B.
J. Biol. Chem. **35**: 21704-8.
- Dehio, C., Gray-Owen, S.D., Meyer, T.F.** (2000) Host cell invasion by pathogenic *Neisseriae*.
Subcell Biochem. **33**: 61-96.
- Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H., Lanz, C.** (1997) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome.
J. Cell Sci. **18**: 2141-54.
- Delany, I., Rappuoli, R., Scarlato, V.** (2004) Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*.
Mol. Microbiol. **4**: 1081-90
- De Vries, F.P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M., van Putten, J.P.** (1998) *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors.

Mol. microbiol. **27**: 1203-1212.

Dunn, K.L., Farrant, J.L., Langfor, P.R., Kroll, J.S. (2003) Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated *Neisseria meningitidis* from phagocytosis by human monocytes/macrophages. Infect. Immun. **71**: 1604-1607.

Eliasof, S., Arriza, J.L., Leighton, B.H., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G. (1998) Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. J. Neurosci. **18**: 698–712.

Elmansi, E.M.T., Hoims, W.H. (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. J. Gen. Microbiol. **135**: 2875-2883.

Engelke, T., Jording, D., Kapp, D., Puhler, A. (1989) Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* *dctA* gene encoding the C4-dicarboxylate carrier. J. Bacteriol. **171**: 5551–5560.

Erwin, A.L., Gotschlich, E.C. (1993) Oxidation of D-lactate and L-lactate by *Neisseria meningitidis*: purification and cloning of meningococcal D-lactate dehydrogenase. J. Bacteriol. **175**: 6382-6391.

Erwin, L.A., Gotschlich, E.C. (1996) Cloning of a *Neisseria meningitidis* gene for L-lactate dehydrogenase (L-LDH): evidence for a second meningococcal L-LDH with different regulation. J. Bacteriol. **178**: 4807-4813.

Exley, R.M., Goodwin, L., Mowe, E., Shaw, J., Smith, H., Read, R.C., Tang, C.M. (2005) *Neisseria meningitidis* lactate permease is required for nasopharyngeal colonization. Infect. Immun. **9**: 5762-5766.

Feavers, I.M., Heath, A.B., Bygraves, J.A., Maiden, M.C.J. (1992) Role of horizontal genetic exchange in antigenic variation of the class 1 outer membrane protein of *Neisseria Meningitidis*. Mol. Microbiol. **6**: 489-495.

Fernstrom, J.D., Wurtman, R.J., Hammarstrom-Wiklund, B., Rand, W.M., Munro, H.N., and C. S. Davidson, C.S. (1979) Diurnal variations in plasma concentrations of tryptophan, tyrosine, and other neutral amino acids: effect of dietary protein intake. Am. J. Clin. Nutr. **32**: 1912–1922.

Finan, T.M., Oresnik, I., Bottacin, A. (1988) Mutants of *Rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism. J. Bacteriol. **170**: 3396–3403.

Finan, T.M., Wood, J.M., Jordan, D.C. (1981) Succinate transport in *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. **148**: 193–202.

Finney, D.J. (1971) Probit analysis 3rd edition.
London, UK: Cambridge University Press.

Fischer, R.S., Martin, G.C., Rao, P., Jensen, R.A. (1994) *Neisseria gonorrhoeae* possesses two nicotinamide adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenases.
FEMS Microbiol. **115**: 39-44.

Flexner, S. (1907) Experimental cerebrospinal meningitis in monkeys.
J. Exp. Med. **9**: 142-166.

Forest, K.T., Dunham, S.A., Koomey, M., Tainer, J.A. (1999) Crystallographic structure reveals phosphorylated pilin from *Neisseria*: phosphoserine sites modify type IV pilus surface chemistry and fibre morphology.
Mol. Microbiol. **3**: 743-52.

Frash, C.E. (1979) Non-capsular surface antigens of *Neisseria meningitidis*.
Semin. Infec. Dis. **2**: 304-337.

Frash, C.E., Robbins, J.D. (1978) Protection against group B meningococcal disease. II. Infection and resulting immunity in guinea pig model.
J. Exp. Med. **147**: 619-628.

Frash, C.E., Zollinger, W.D., Poolman, J.T. (1985) Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes.
Rev. Infect. Dis. **7**: 504-510.

Frosch, M., Schultz, E., Glenn-Calvo, E., Meyer, T.F. (1990) Generation of capsule-deficient *Neisseria meningitidis* strains by homologous recombination.
Mol. Microbiol. **4**: 1215-1218.

Frosch, M., Weisgerber, C., Meyer, T.F. (1989) Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B.
Proc Natl Acad Sci U S A. **5**: 1669-73.

Fukuda, M. (1991) Lysosomal glycoproteins: structure, biosynthesis and intracellular trafficking.
J. Biol. Chem. **266**: 21327-21330.

Gao, L., Parsons, N.J., Curry, A., Cole, J.A., Smith, H. (1998) Lactate causes changes in gonococci including increased lipopolysaccharide synthesis during short-term incubation in media containing glucose.
FEMS Microbiology Letters **169**: 309-316.

Genco, C.A., Desai, P.J. (1996) Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*.
Trends Microb. **5**: 179-184.

Giardina, P.C., Williams, R., Lubaroff, D., Apicella, M.A. (1998) *Neisseria gonorrhoeae* induces focal polymerization of actin in primary human urethral epithelium.
Infect Immun. **7**: 3416-9

Greenfield, J.G., Lantos, P.L., Graham, D.I. (2002)
Greenfield's Neuropathology 7th edition. New York

Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G., Genco, C.A. (2003) Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B.
Proc Natl Acad Sci. **16**: 9542-7.

Halpern, Y.S., Lupo, M. (1965) Glutamate transport in wild-type and mutant strains of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **5**: 1288-95.

Halter, R., Pohler, J., Meyer, T.F. (1989) Mosaic-like organization of IgA protease genes in *Neisseria gonorrhoeae* generated by horizontal genetic exchange in vivo.
EMBO J. **8**: 2737-2744.

Halter, R., Pohler, J., Meyer, T.F. (1994) IgA protease of *Neisseria meningitidis*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product.
EMBO J. **3**: 1595-1601.

Hammerschmidt, S., Birkolz, C., Zahringer, U., Robertson, B.D., van Putten, J., Ebeling, O., Frosch, M. (1994) Contribution of genes from the capsule gene complex (cps) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*.
Mol. Microbiol. **11**: 885-896.

Hammerschmidt, S., Muller, A., Silliman, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, R., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., Frosch, M. (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (SiaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease.
Mol. Microbiol. **20**: 1211-1220.

Hassett, D.J., Cohen, M.S. (1989) Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells.
FASEB J. **3**: 2574-2582.

Helling, R.B. (1994) Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate?
J. Bacteriol. **176**: 4664-4668.

Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W. (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection.
Science. **269**: 400-403.

Heyne, R. I., de Vrij, W., Crielaard, W., Konings, W.N. (1991) Sodium ion-dependent amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus stearothermophilus*.
J. Bacteriol. **173**: 791-800.

- Hill, J.C.** (1971) Effect of glutamate on exogenous citrate catabolism of *Neisseria meningitidis* and of other species of *Neisseria*.
J. Bacteriol. **106**: 819–823.
- Holbein, B.E.** (1980) Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice.
Infect. Immun. **3**: 886-91.
- Holbein, B.E., Jericho, K.W., Likes, G.C.** (1979) *Neisseria meningitidis* infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strains, and pathology.
Infect. Immun. **2**: 545-51.
- Holten, E.** (1973) Glutamate dehydrogenases in genus *Neisseria*.
Acta Path. Microbiol. Scand. **81**: 49-58.
- Holten, E.** (1974) 6-Phosphogluconate dehydrogenase and enzymes of the Entner-Doudoroff pathway in *Neisseria*.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol. Immunol. **82**: 207-213.
- Holten, E.** (1976) Pyridine nucleotide independent oxidation of L-malate in genus *Neisseria*.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. **84**: 17-21.
- Holten, E., Jyssum, K.** (1973) Glutamate dehydrogenases in *Neisseria meningitidis*.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol. Immunol. **81**: 43-48.
- Hook, E.W., Holmes, K.K.** (1985) Gonococcal infections.
Ann Intern Med. **102**: 229-43.
- Householder, T.C., Belli, W.A., Lisseden, S., Cole, J.A., Clark, V.L.** (1999) Cis- and trans- acting elements involved in regulation of *omiA*, the gene encoding the major anaerobically induced outer membrane protein in *Neisseria gonorrhoeae*.
J. Bacteriol. **181**: 541-551.
- Householder, T.C., Fozo, E.M., Cardinale, J.A., Clark, V.L.** (2000) Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, *norB*, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide.
Infection and immunity **9**: 5241-5246.
- Huet, M.M., Suire, A.** (1976) Mise en evidence de la bacteriemie chez la souris. C. R. Acad. Sci. **283**: 421-422
- Jarvis, G.A.** (1995) Recognition and control of neisserial infection by antibody and complement.
Trends Microbiol. **3**: 198-201.
- Jennings, M.P., Virji, M., Evans, D., Foster, V., Srikhanta, Y.N., Steeghs, L., van der Ley, P., Moxon, E.R.** (1998) Identification of a novel gene involved in pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis*.
Mol Microbiol. **4**: 975-84.

Johansson, L., Rytönen, A., Bergman, P., Albiger, B., Källström, H., Hökfelt, T., Agerberth, B., Cattaneo, R., Jonsson, A.B. (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science* **301**: 373-375.

Jones, M.D. (1995) Epidemiology of meningococcal disease in Europe and the USA. K.Cartwright (ed.), *Meningococcal disease*, p.71-114.

Jones, M.D., Borrow, R., Fox, A.J., Gray, S., Cartwright, K.A., Poolman, J.T. (1992) The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb. Pathog.* **13**: 219-224.

Jonsson, A.B., Nyberg, G., Normark, S. (1991) Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J.* **2**: 477-88.

Kallstrom, H., Islam, M.S., Berggren, P.O., Jonsson, A.B. (1998) Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J. Biol. Chem.* **273**: 21777-21782.

Kallstrom, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Jonsson, A.B. (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **25**: 639-47.

Kanai, Y. (1997) Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Opin. Cell biol.* **9**: 565-572.

Karganov, M., Romanova, G., Braslawsky, W., Tarshitz, D., Telegdy, G. (1998) Neuromodulator role of VIP in recovery of rat behavior and brain neurotransmitters level after frontal lobectomy. *Ann NY Acad Sci* **865**: 519-522.

Kornfeld, S., Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**: 483-525.

Kovacevic, Z., McGivan, J.D. (1983) Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol. Rev.* **63**: 547-605.

Kuratana, M., Anderson, P. (1991) Host metabolites that phenotypically increase the resistance of *Haemophilus influenzae* type b to clearance mechanisms. *J Infect Dis.* **5**: 1073-9.

Laskos, L., Dillard, J.P., Seifert, H.S., Fyfe, J.A., Davies, J.K. (1998) The pathogenic *neisseriae* contain an inactive *rpoN* gene and not utilize the *pilE* sigma54 promoter. *Gene.* **208**: 95-102.

Lavitola, A., Bucci, C., Salvatore, P., Maresca, G., Bruni, C.B., Alifano, P. (1999) Intracistronic transcription termination in polysialyltransferase gene (*siaD*) affects phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **33**: 119-127.

- LeClerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., Cerula, T.A.** (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*. **274**: 1208-1211.
- Leighton, P.M., Kelly, D.J., Williamson, P.M., Shaw, J.G.** (2001) An NMR and enzyme study of the carbon metabolism of *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*. **147**: 1473- 1482.
- Lin, L., Larson, P., Mulks, J., Fukuda, M., Carlson, S.R., Enns, M.** (1997) The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **24**: 1083-1094.
- Lisseden, S., Mohan, S., Overton, T., Regan, T., Crooke, H., Cardinale, J.A., Householder, T.C., Adams, P., O'Conner, C.D., Clark, V.L., Smith, H., Cole, J.A.** (2000) Identification of transcription activators that regulate gonococcal adaption from aerobic to anaerobic or oxygen-limited growth. *Mol. Microbiol.* **37**: 839-855.
- Lolkema, J.S., Slotboom, D.J.** (1998) Estimation of structural similarity of membrane proteins by hydropathy profile alignment. *Mol. Membr. Biol.* **15**: 33-42.
- Mackinnon, F.G., Gorringe, A.R., Funnell, S.G., Robinson, A.** (1992) Intranasal infection of infant mice with *Neisseria meningitidis*. *Microb. Pathog.* **6**: 415-20.
- Magasanik, B.** (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu Rev Genet.* **16**: 135-68.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G.** (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **6**: 3140-3145.
- Makino, S., van Putten, J.P., Meyer, T.F.** (1991) Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *EMBO J.* **6**: 1307-15.
- Mandrell, R.E., Apicella, M.A.** (1993) Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiol.* **187**: 382-402.
- Manning, P.A., Kaufmann, A., Roll, U., Pohlner, J., Meyer, T.F., Haas, R.** (1991) L-pilin variants of *Neisseria gonorrhoeae* MS11. *Mol. Microbiol.* **5**: 917-926.
- Marcus, M., Halpern, Y.S.** (1967) Genetic analysis of glutamate transport and glutamate decarboxylase in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. **93**: 1409-1415.

Massari, P., Ram, S., Macleod, H., Wetzler, L.M. (2003) The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. Trends Microbiol. **11**: 87-93.

McPherson, J.M., Wootton, J.C. (1983) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *gdhA* gene. Nucleic Acids Research. **11**: 5257-66.

Mecas, J. (2002) Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. Curr. Opin. Microbiol. **5**: 33-37.

Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W., Holden, D.W. (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteria using signature-tagged mutagenesis. Mol. Microbiol. **26**: 399-407.

Meldrum, B., Garthwaite, J. (1990) excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacolo. Sci. **11**: 379-387

Merrik, M.J., Edwards, R.A. (1995) Nitrogen control in Bacteria. Microbiological Reviews. **59**: 604-622.

Merz, A.J., So, M. (2000) Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **16**: 423-457.

Meyer, T.F., Gibbs, C.P., Haas, R. (1990) Variation and control of protein expression in *Neisseriae*. An. Rev. Microbiol. **44**: 451-477.

Meyer, T.F., Phlner, J., van Putten, J.P. (1994) Biology of the patogenic *Neisseriae*. Microbiol. Immunol. **192**: 283-317.

Miller, C.P. (1933) Experimental meningococcal infection of mice. Scienze **78**: 340-341.

Miller, E.S., Brenchley, J.E. (1984) Cloning and characterization of *gdhA*, the structural gene for glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **157**: 171-178.

Møller, A.S., Bjerre, A., Brusletto, B., Joø, G.B., Brandtzaeg, P., Kierulf, P. (2005) Chemokine patterns in meningococcal disease. J. Infect. Dis. **5**: 768-75.

Monaco, C., Talà, A., Spinosa, M.R., Progida, C., De Nitto, E., Gabello, A., Bruni, C.B., Bucci, C., Alifano, P. (2006) Identification of a meningococcal l-glutamate ABC transporter operon essential for growth in low sodium environments. Infect. Immun. **3**: 1725-1740.

- Monod, J., Chaneux, J.P., Jacob, A.F.** (1963) Allosteric proteins and cellular control systems.
J. Mol. Biol. **6**: 306-329.
- Morawietz, G., Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Bube, A., Keane, K., Halm, S., Heuser, A., Hellmann, J.** (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice. Part 3. Exp Toxicol Pathol **55**: 433-449
- Morelli, G., del Valle, J., Lammel, C.J., Pohlner, J., Müller, K., Blake, M., Brooks, G.F., Meyer, T.F., Koumaré, B., Brieske, N., Achtmann, M.** (1994) Immunogenicity and evolutionary variability of epitopes within IgA1 protease from serogroup A *Neisseria meningitidis*.
Mol. Microbiol. **1**: 175-87.
- Morse, S.A., Hebeler, B.H.** (1978) Effect of pH on the growth and glucose metabolism of *Neisseria gonorrhoeae*.
Infect. Immun. **21**: 87-95.
- Mountain, A., McPherson, M.J., Baron, A.J., Wootton, J.C.** (1985) The *Klebsiella aerogenes* glutamate dehydrogenase (*gdhA*) gene: cloning, high-level expression and hybrid enzyme formation in *Escherichia coli*.
Mol. Gen. Genet. **199**: 141-145.
- Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A., Lenski, R.E.** (1994) Adaptative evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria.
Curr. Biol. **4**: 24-33.
- Nassif, X., Beretti, J.L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J., Normark, S., So, M.** (1994) Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells.
Proc Natl Acad Sci USA **91**: 3769-3773.
- Nassif, X., Pujol, C., Morand, P., Eugene, E.** (1999) Interactions of pathogenic *Neisseria* with host cells. Is it possible to assemble the puzzle?
Mol. Microbiol. **32**: 1124-1132.
- Pagliarulo, C., Salvatore, P., De Vitis, L.R., Colicchio, R., Monaco, C., Tredici, M., Talà, A. Bardaro, M., Lavatola, A., Bruni, C.B., Alifano, P.** (2004) Regulation and differential expression of *gdhA* encoding NADP-specific glutamate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis* clinical isolates.
Mol. Microbiol. **51**: 1757-1772.
- Parkhill, J., Achtman, M., James, K.D., Bentley, S.D., Churcher, C., Klee, S.R., Morelli, G., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Davies, M.R., Davis, P., Devlin, K., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Mungai, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Simmonds, M., Skelton, J., Whitehead, S., Spratt, B.G., Barrell, B.G.** (2000) Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491.
Nature **404**: 502-506.

- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier, M.H.** (1998) Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities.
J. Mol. Biol. **277**: 573–592.
- Pavliak, V., Briosson, J.R., Michon, F., Uhrin, D., Jennings, H.J.** (1993) Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*.
J. Biol. Chem. **268**: 14146-14152.
- Petersen, M., Fessner, W., Frosch, M., Luneberg, E.** (2000) The *siaA* gene involved in capsule polysaccharide biosynthesis of *Neisseria meningitidis* B codes for N-acetylglucosamine-6-phosphate 2-epimerase activity.
FEMS Microbiol. Lett. **184**: 161-164.
- Pillon B, Bazin B, Deweer B, Ehrle N, Baulac M, Dubois B.** (1999) Specificity of memory deficits after right or left temporal lobectomy.
Cortex **35**: 561-571.
- Pizza, M., Scarlato, V., Maignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G.T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C.L., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P., Broeker, M., Hundt, E., Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D.W., Jeffries, A.C., Saunders, N.J., Granoff, D.M., Ventre, J.C., Moxon, E.R., Grandi, G., Rappuoli, R.** (2000) Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing.
Science **287**: 1816-1820.
- Plaxinos, G., Franklin, K.B.J.** (2001) The mouse brain in stereotaxis coordinates. Second Deluxe edition. Academic Press.
- Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., Simon, D.** (1998) Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*.
Infect. Immun. **66**: 5620-5629.
- Rahman, M., Kallstrom, H., Normark, S., Jonsson, A.B.** (1997) PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface.
Mol. Microbiol. **25**: 11-25.
- Reed, L.J., Muench, H.** (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints.
Am. J. Hyg. **27**: 493-497.
- Reitzer, L., Schneider, B.L.** (2001) Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*.
Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**: 422-444.
- Richardson, A.R., Stojiljkovic, I.** (2001) Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*.
Mol. Microbiol. **40**: 645-655.
- Rigali S., Derouaux, A., Gianotta, F., Dusart, J.** (2002) Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies.

J. Biol. Chem. **277**: 12507-12515.

Robertson, B.D., Meyer, T.F. (1992) Genetic variation in pathogenic bacteria. Trends Genet. **8**: 422-427.

Saier, M.H.Jr. (1998) Transport protein classification. [Online.] [http:// www-biology.ucsd.edu/msaier/transport/](http://www-biology.ucsd.edu/msaier/transport/). [30 November 1998, last date accessed.].

Salit, I.E., Tomalty, L. (1984) Experimental meningococcal infection in neonatal mice: differences in virulence between strains isolated from human cases and carriers. Can J Microbiol. **8**: 1042-5.

Salit, I.E., Van Melle, E., Tomalty, L. (1984) Experimental meningococcal infection in neonatal animals: models for mucosal invasiveness. Can J Microbiol. **8**: 1022-9.

Salvatore, P., Bucci, C., Pagliarulo, C., Tredici, M., Colicchio, R., Cantalupo, G., Bardaro, M., Del Giudice, L., Massardo, R.D., Lavitola, A., Bruni, C.B., Alifano, P. (2002) Phenotypes of a Naturally Defective *recB* Allele in *Neisseria meningitidis* Clinical Isolates. Infect. Immun. **70**: 4185-4195.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E.R., Achtman, M. (1994) Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. Mol. Microbiol. **13**: 207-217.

Saukkonen, K. (1988) Experimental meningococcal meningitis in the infant rat. Microb. Pathog. **4**: 203-11.

Saunders, N.J., Jeffries, A.C., Peden, J.F., Hood, D., Tettelin, H., Rappuoli, R., Moxon, E.R. (2000) Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. Mol. Microbiol. **37**: 207-215.

Scheuerpflug, I., Rudel, T., Ryll, R., Pandit, J., Meyer, T.F. (1999) Roles of PilC and Pile proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. Infect. Immun. **67**: 834-43.

Schneider, H., Griffiss, J.M., Boslego, J.W., Hitchcock, P.J., Zahos, K.M., Apicella, M.A. (1991) Expression of paragloboside-like lipooligosaccharides may be a necessary component of gonococcal pathogenesis in men. J. Exp. Med. **174**: 1601-1606.

Schryvers, A.B., Stojilkovic, I. (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*.

Mol. Microbiol. **37**: 207-215.

Seifert, H.S. (1996) Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation.
Mol. Microbiol. **21**: 433-440.

Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.
Appl. Environ Microbiol. **51**: 873-884.

Shafqat, S., Tamarappoo, B.K., Kilberg, M.S., Puranam, R.S., McNamara, J.O., Guadano-Ferraz, A., Freneau, R.T.Jr. (1993) Cloning and expression of a novel Na(1)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na1/glutamate cotransporters.
J. Biol. Chem. **268**: 15351–15355.

Shaw, J.H., Falkow, S. (1988) Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*.
Infect. Immun. **56**: 1625-1632.

Shea, E.J., Santangelo, J.D., Feldman, R.G. (2000) Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens.
Curr. Opin. Microbiol. **3**: 451-458.

Slotboom, D.J., Konings, W.N., Lolkema, J.S. (1999) Structural features of the glutamate transporter family.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **2**: 293-307.

Smith, H. (1975) Modern diseases and their control.
Infectious. Community Health (Bristol). **4**: 235-237.

Smith, H., Yates, E.A., Cole, J.A., Parsons, N.J. (2001) Lactate stimulation of gonococcal metabolism in media containing glucose: mechanism, impact on pathogenicity, and wider implications for other pathogens.
Infect. Immun. **69**: 6565-6572.

Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-heikkila, I., Rosenow, C., Masure, H.R. (1996) Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*.
Mol. Microbiol. **19**: 803-813.

Spinosa, M.R., Progida, C., Talà, A., Cogli, L., Alifano, P., Bucci, C. (2007) The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells.
Infect Immun. **7**: 3594-603.

Spratt, B.G., Bowler, L.D., Zhang, Q.Y., Zhon, J., Smith, J.M. (1992) Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species.
J. Mol. Evol. **34**: 115-125.

- Stephens, D., McGee, Z.** (1981) Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surface: influence of pili and type of receptor cell.
J. Infect. Dis. **143**: 525-32.
- Stephens, D.S., Whitney, A.M., Rothbard, J., Schoolnik, G.K.** (1985) Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili.
J. Exp. Med. **161**: 1539-53.
- Stephens, D.S., Zimmer, S.M.** (2002) Pathogenesis, Therapy, and Prevention of Meningococcal Sepsis.
Curr. Infect. Dis. Rep. **5**: 377-386.
- Stern, A., Meyer, T.F.** (1987) Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae.
Mol. Microbiol. **1**: 5-12.
- Strom, M.S., Nunn, D.N., Lory, S.** (1993) A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family.
Proc Natl Acad Sci U S A. **6**: 2404-8.
- Sun, Y.H., Bakshi, S., Chalmers, R., Tang, C.M.** (2000) Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis.
Nat. Med. **6**: 1269-1273.
- Tettelin, H., Saunders, N.J., Heidelberg, J., Jeffries, A.C., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Ketchum, K.A., Hood, D.W., Peden, J.F., Dodson, R.J., Nelson, W.C., Gwinn, M.L., DeBoi, R., Peterson, G.D., Hickey, E.K., Haft, D.H., Salzberg, S.L., White, O., Fleischmann, R.D., Dougherty, B.A., Mason, T., Ciecko, A., Parksey, D.S., Blair, E., Cittone, H., Clark, E.B., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Khouri, H., Queen, H., Vamathevan, J., Gill, J., Scarlato, V., Maignani, V., Pizza, M., Grandi, G., Sun, L., Smith, H.O., Fraser, C.M., Moxon, E.R., Rappuoli, R., Venter, J.C.** (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58.
Science **287**: 1809-1815.
- Tolner, B., Poolman, B., Konings, W.N.** (1992) Characterization and functional expression in *Escherichia coli* of the sodium/proton/glutamate symport proteins of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldovenax*.
Mol. Microbiol. **6**: 2845–2856.
- Tolner, B., Ubbink-Kok, T., Poolman, B., Konings, W.N.** (1995) Cationselectivity of the L-glutamate transporters of *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldovenax*: dependence on the environment in which the proteins are expressed.
Mol. Microbiol. **18**: 123–133.
- Toropainen, M., Kayhty, H., Saarinen, L., Rosenqvist, E., Hoiby, E.A., Wedege, E., Michaelsen, T., Makela, P.H.** (1999) The infant rat model adapted to evaluate human sera for protective immunity to group B meningococci.
Vaccine. **17**: 2677-89.

- Tsai, P.J., Huang, P.C.**, (1999) Circadian variations in plasma and erythrocyte concentrations of glutamate, glutamine, and alanine in men on a diet without and with added monosodium glutamate. *Metabolism* **48**: 1455–1460.
- Tzanakaki, G., Urwin, R., Musilek, M., Kriz, P., Kremastinou, J., Pangalis, A., Blackwell, C.C., Maiden, M.C.** (2001) Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J. Clin. Microbiol.* **4**: 1235-40.
- Tzeng, Y.L., Stephens, D.S.** (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect.* **6**: 687-700.
- Ulmer, J.B., Burke, C.J., Friedman, A., Donnelly, J.J., Liu, M.A.** (1992) Pore formation and mitogenicity in blood cells by class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 19266-19271.
- Van Putten, J.M.P.** (1993) Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno- resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J.* **12**: 4043-4051.
- Virji, M.** (1996) Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **4**: 466- 469.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J.P., Achman, M., Sarkari, J., Moxon, E.R.** (1992b) Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2785-2795.
- Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonnas, R.** (1996) The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **22**: 929-939.
- Vogel, U., Frosch, M.** (1999) Mechanism of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* **32**: 1133-1141.
- Vogel, U., Hammerschmidt, S., Frosch, M.** (1996) Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant. *Med. Microbiol. Immunol.* **185**: 81-87.
- Von Loewenich, F.D., Wintermeyer, E., Dumig, M., Rosch, M.F.** (2001) Analysis of transcriptional control mechanism of capsule expression in *Neisseria meningitidis*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 361-369.
- Weel, J.F., Van Putten, J.P.** (1991) Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. *Res. Microbiol.* **142**: 985-993.

Welch, S.B., Nadel, S. (2003) Treatment of meningococcal infection.
Arch Dis Child. 7: 608-14.

Wen, K.K., Giardina, P.C., Blake, M.S., Edwards, J., Apicella, M.A., Rubenstein, P.A. (2000) Interaction of the gonococcal porin P.IB with G-and F-actin.
Biochemistry **39**: 8638-8647.

Williams, J.M., Chen, G.C., Zhu, L., Rest, R.F. (1998) Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth.
Mol. Microbiol. **27**: 171-186.

Wolfe, A.J., Chang, D.E., Walker, J.D., Seitz-Partridge, J.E., Lange Vidaurri, C.F., Prub, B.M., Henc, M.C., Larkin, J.C., Conway, T.L. (2003) Evidence that acetyl phosphate function as a global signal during biofilm development.
Mol. Microbiol. **48**: 2345-2356.

Zhou, J., Spratt, B.G. (1992) Sequence diversity within the *argF*, *fbp* and *recA* genes of natural isolates of *Neisseria meningitidis* inter-species recombination within the *argF* gene.
Mol. Microbiol. **6**: 2135-2146.

